

**Bei Ascaris suum ist die keimbahnbegrenzte DNA
präferentielles Substrat für die DNA-Topoisomerase I
und eine neuartige Endonucleaseaktivität,
beide aus Embryonen mit Chromatindiminution**

Pidder JANSEN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Bei Ascaris suum ist die keimbahnbegrenzte DNA
präferentielles Substrat für die DNA-Topoisomerase I
und eine neuartige Endonucleaseaktivität,
beide aus Embryonen mit Chromatindiminution**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität
vorgelegt von

Pidder JANSEN

aus München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karl B. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1986

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Erläuterung der verwendeten Abkürzungen	4
I. Einleitung	5
II. Material und Methoden	
1. Materialien	9
2. Spezielle Methoden	
2. 1. Isolierung und Charakterisierung von DNA	10
2. 2. Reinigung und Charakterisieren von enzymatischen Aktivitäten	15
2. 3. DNA-Protein-Bindungstests	17
III. Ergebnisse	
1. Organisation der im Soma verbleibenden Kopien der hochrepetitiven keimbahnbegrenzten Satelliten-DNA	19
1. 1. Restriktionsanalyse der soma sat DNA	19
1. 2. Hypersensitivität der soma sat DNA gegen Exonuclease Bal 31	21
1. 3. Untersuchung der Chromatinorganisation	23
1. 4. Test auf potentielle Z-DNA-Konformation	25
2. Isolierung von DNA-adressierten Enzymen aus diminutionsbereiten Entwicklungsstadien	

	Seite
2. 1. Isolierung von DNA-Topoisomerase I	27
2. 2. Gewinnung einer Endonucleaseaktivität	29
2. 3. Hinweis auf DNA-Topoisomerase II	31
3. Wechselwirkungen zwischen DNA-Topoisomerase I und besonderen DNA-Sequenzen, insbesondere der hochrepetitiven keimbahnbegrenzten DNA von <u>Ascaris suum</u>	
3. 1. Charakterisierung des Inserts aus keimbahnbegrenzter Satelliten-DNA im Plasmid pAs 6	33
3. 2. Die Topoisomerase I bindet präferentiell an klonierte wie auch an authentische kb sat-DNA von <u>A. suum</u>	37
3.3. Die Endonuclease linearisiert superhelikale DNA an wenigen ausgezeichneten Positionen	41
3.3.1. Kartierung der Schnittstellen in pUC 8-DNA	41
3.3.2. Zuordnung von Endonucleaseschnittstellen und Sekundärstrukturen in pUC 8-DNA	57
3.3.3. Kartierung von Schnittstellen für die <u>Ascaris</u> -Endonuclease in kb sat DNA aus <u>A. suum</u>	58
IV. Diskussion	
1. Die Organisation der im Somagenom verbleibenden Satelliten-DNA	63

	Seite
2. Charakterisierung der DNA-Topoisomerase I, Beziehung zu der Endonucleaseaktivität	65
3. Zur Frage der Natur der von der Endonuclease erkannten Schnittstellen	69
4. Zusammenfassung der Resultate und deren Interpretation bezüglich möglicher Mechanismen der DNA-Neuordnung im Zuge der Chromatindiminution	78
5. Ein Modell zum Mechanismus der Chromatindiminution bei Ascaris	80
V. ZUSAMMENFASSUNG	82
VI LITERATUR	84

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen

Im folgenden werden nachstehende Abkürzungen verwendet:

kb sat DNA: hochrepetitive DNA des Keimbahngenoms von A. suum, die sich als Satelliten-DNA darstellen läßt. Mit kb sat-DNA wird auch das klonierte Fragment bezeichnet, das im Plasmid pAs 6 enthalten ist, da es aus kb sat-DNA stammt.

soma sat DNA: Kopien der hochrepetitiven kb sat DNA, die im somatischen Genom verbleiben

sc-DNA: supercoil-DNA, d.h. kovalent geschlossene ringförmige Plasmid-DNA, die eine relativ hohe Anzahl superhelikaler Windungen enthält. Sie wurde gewonnen aus dem Stamm E. coli HB 101.

oc-DNA: ringförmige Plasmid-DNA, die mindestens einen Einzelstrangbruch aufweist.

topo I: DNA-Topoisomerase Typ I aus Embryonen von A. suum

endo: DNA-Endonuclease aus Embryonen von A. suum

PNK: T₄-Polynucleotidkinase

U: Einheit der enzymatischen Aktivität

kb: Kilobasen

bp: Basenpaare

MET: β -Mercaptoäthanol

EtBr: Ethidiumbromid

I. EINLEITUNG

Die Determination zu somatischen Zellen im Verlauf der Frühentwicklung ist bei einer Reihe von Eukaryonten gekennzeichnet durch eine irreversible Kerndifferenzierung, die eine erhebliche Reduzierung der Genomgröße, verglichen mit dem Genom der Keimbahnzellen, zur Folge hat. Ein solcher Vorgang wurde zuerst von Boveri (1887) beobachtet, der die Elimination heterochromatischen Materials, bezeichnet als Chromatindiminution, untersuchte, die in den Ursomablastomeren des Nematoden Parascaris equorum stattfindet. Daraufhin wurden vergleichbare Vorgänge bei weiteren Spezies aus verschiedenen Tierstämmen nachgewiesen, insbesondere bei Ascaris suum, einer weiteren Nematodenart (Meyer 1895, Bonnevie 1903), sowie bei Insekten (Bauer & Beermann 1952), Crustaceen (Haecker 1897, Beermann 1977) und Ciliaten (Ammermann 1971).

Während die cytologischen Details der Eliminationsprozesse bei den einzelnen Spezies relativ gut beschrieben sind, dies gilt insbesondere für den in unserem Labor intensiv studierten Pferdespulwurm Parascaris equorum (vgl. insbesondere Goday & Pimpinelli 1984, Bogenberger 1979, Neumüller 1985, Seidl 1985), liegen nur wenige Daten über molekulare Mechanismen der Elimination vor: Bei Ascaris wurde die eliminierte DNA durch Restriktionsanalyse (Roth & Moritz 1981, Teschke 1985) sowie im Falle von A. suum zusätzlich durch Sequenzanalyse (Streeck et al. 1982) charakterisiert. Die DNA-Elimination, die im Zuge der Macronucleusdifferenzierung bei Ciliaten stattfindet, ist durch Sequenzvergleiche zwischen Genen des Macronucleus und deren Vorläufern im Micronucleus (Klobutcher et al. 1984) sowie die Charakterisierung von Intermediaten des Eliminationsprozesses (Roth & Prescott 1985, Austerberry et al. 1985) bezüglich der beteiligten DNA-Sequenzen gut charakterisiert.

Die cytologische Analyse der Diminution bei Ascaris suum (Kolin 1977) ergab folgende Befunde: Die Keimbahnchromosomen enthalten sowohl endständiges wie auch interstitielles Heterochromatin. Das gesamte Heterochromatin wird im Zuge der Diminution eliminiert. Die Zahl der Chromosomen wird dabei

nicht verändert ($n = 19 A + 5 X$ in Soma und Keimbahn) (Edwards 1910, Bogenberger 1979). Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen über den möglichen Mechanismus der Chromatindiminution: Elimination endständigen Heterochromatins erfordert die Neubildung von Telomeren. Elimination interkalaren Materials erfordert das Verheilen des unterbrochenen DNA-Stranges.

Konzertiertes Unterbrechen und Religieren von DNA-Molekülen stellt die charakteristische Reaktion einer bestimmten Gruppe von DNA-adressierten Enzymen dar, der DNA-Topoisomerasen (Gellert 1981). Die für die Elimination von interkalarem Material zu fordernde nicht-konservative Neuverknüpfung von DNA-Einzelsträngen unterschiedlicher Herkunft ist ebenfalls in einigen Fällen als Topoisomerase I-abhängige Reaktion dargestellt worden (Halligan et al. 1982). Da im Zuge der Chromatindiminution die Exzision von DNA im Grenzbereich zwischen Euchromatin und Heterochromatin stattfindet, hat der Kondensationszustand der DNA möglicherweise wesentliche Funktion für den Ablauf des Eliminationsereignisses.

Durch mikrophotometrische Messungen an isolierten Keimbahnchromosomen von Parascaris equorum konnte gezeigt werden, daß der Gehalt an kb sat DNA nicht konstant ist, wenn verschiedene Individuen verglichen werden (Moritz 1970). Zur Erklärung des Phänomens wird die Hypothese aufgestellt, daß die chromosomenendständigen Kopien der kb sat DNA in der Keimbahn relativ häufig einen Amplifikationszyklus durchlaufen, der in verschiedenen Individuen in unterschiedlichem Ausmaß stattfindet (Roth & Moritz 1981).

Eine einheitliche Modellvorstellung über den Mechanismus der Chromatindiminution muß also folgende, aus der cytologischen Analyse erschlossenen Fakten erklären: telomerische DNA-Amplifikation, Neubildung von Telomeren, Exzision von interkalarem Material. Aus diesen Erfordernissen sowie der Tatsache, daß einerseits der größte Teil der hochrepetitiven DNA (Roth & Moritz 1976), andererseits aber single-copy DNA nur zu einem marginalen Anteil eliminiert wird (Tobler 1985), wurde von Moritz (1984 a) unter Berücksichtigung der Eigenschaften der kb sat DNA - Ausbildung von

foldback Strukturen in vitro, einheitliche Länge aller Kopien der repetitiven Einheit, Konservierung von Sequenzmerkmalen im Laufe der Evolution der kb sat DNA - als Arbeitshypothese folgende Modellvorstellung zum Ablauf der Diminution postuliert: Die Satelliten-DNA bildet durch Rückfaltung unter Beteiligung mehrerer repetitiver Einheiten eine Überstruktur im Chromatin aus, an der eine DNA-Topoisomerase eine Neuverknüpfung der DNA-Stränge ausführt. Als Resultat dieses Vorgangs werden interkalare Sequenzen aus dem Chromosom entfernt, ohne daß dessen Kontinuität aufgehoben wäre ("rekombinative Exzision", Landy & Ross 1977). Auch die Neubildung von Telomeren wird durch diese Hypothese eingeschlossen, wobei in diesem Fall lediglich die zur Verfügung stehenden DNA-Einzelstränge auf andere Art neu verknüpft werden. Diese Reaktion führt zu einer Abkopplung der terminalen Heterochromatinblöcke (Moritz 1984 b).

Ausgehend von dieser Arbeitshypothese habe ich im Rahmen dieser Arbeit DNA-adressierte Enzyme aus diminutionsbereiten Stadien isoliert und auf spezifische Wechselwirkungen mit der kb sat DNA untersucht. Eine sequenzspezifische Endonuclease wurde nicht gefunden. Es konnte eine DNA-Topoisomerase I isoliert werden, die präferentiell an die kb sat DNA von A. suum bindet. Weiterhin wurde eine Endonuclease isoliert, die ausschließlich supercoil-DNA als Substrat benutzt. Die Schnittstellen liegen an definierten Positionen in supercoil-DNA. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in klonierter sat DNA von A. suum eine Schnittstelle erkennt.

Da ein Teil der Satelliten-DNA im Soma verbleibt, habe ich diesen Anteil der Soma-DNA in Bezug auf seine chromosomale Organisation charakterisiert. Insbesondere sollte nach unserer Hypothese diese Region der somatischen Chromosomen durch das vorausgegangene Diminutionseignis geformt sein und wenigstens partiell möglicherweise Rückschlüsse auf die tatsächliche Diminutionsstruktur zulassen. Die vorgelegten Resultate werden mit den bisher verfügbaren Daten über die DNA-Umordnung in anderen Organismen vergleichend diskutiert und in den Rahmen des vorab formulierten Modells zum Ablauf der Chromatindiminution bei Ascaris gestellt. Insbesondere wird auf die Analogie zu der rekombinativen Exzision des Phagen Lambda

aus dem E. coli-Genom (Nash 1981) hingewiesen. Diese Analogie wurde zuerst von Beermann (1977) postuliert, in der vorliegenden Arbeit werden einige Daten zur Unterstützung dieser Modellvorstellung gegeben.

II. MATERIAL UND METHODEN

II. 1. Materialien

Tiermaterial

Lebende adulte Männchen und Weibchen von Ascaris suum wurden frisch vom Münchener Schlachthof bezogen.

Enzyme

Restriktionsendonucleasen wurden von Boehringer Mannheim sowie von BRL bezogen.

Exonuclease Bal 31 wurde von BRL bezogen.

E. coli Polymerase I sowie Klenow Polymerase und T_4 -Polynucleotidkinase wurden von Boehringer Mannheim bezogen.

Pufferlösungen

TES: 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5

1 x SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat

1 x Denhardt: 0.2 % BSA, 0.2 % Polyvinylpyrrolidon, 0.2 % Ficoll 400

TEB-Puffer: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3

Extraktionspuffer: 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (= KP), 10 mM

$NaHSO_3$, 1 mM MET, 1.7 M NaCl, pH 7 (Hsieh & Brutlag 1980)

Bindungspuffer: 100 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1.2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, pH 7.9 (Bushman et al. 1984)

Puffer A:

20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (= KP), 10 mM $NaHSO_3$, 1 mM MET, pH 7 (Hsieh & Brutlag 1980)

Stopppuffer: 50 % Sucrose, 0.1 M EDTA, 0.5 % SDS

Formamidmix: Xylencyanol 0.05 %, Bromphenolblau 0.05 %, 80 % Formamid

NT-Puffer: 50 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM β -Mercaptoäthanol, je 4.75 mmol/l der kalten dNTPs, pH 7.8

PNK-Puffer: 50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithitritol, 0.1 mM Spermidin, 0.1 mM EDTA, pH 7.6

Topoisomerasepuffer: 100 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, pH 7.5 (Hsieh & Brutlag 1980)

Micrococcus-Nuclease-Reaktionspuffer: 50 mM Tris, 10 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.5

S₁ Nuclease Inkubationspuffer: 200 mM NaCl, 75 mM Na Acetat, 1 mM ZnSO₄, pH 4.5
 Triethanolaminpuffer: 50 mM Triethanolamin, 10 mM NaCl, 0.1 mM Dithiotreitol, pH 7.5 (F. Pohl, persönl. Mitteilung)
 Hoechst 33 528-Lösung für Fluoreszenzmessung:
 2 M NaCl, 20 mM NaOH, 0.1 µg/ml Hoechst 33 528 (C. Weijer, pers. Mitteilung)

Radiochemikalien

³²P-α-dATP (spez. Akt. 400 Ci/mmol bzw. 3000 Ci/mmol) sowie ³²P-γ-ATP (3000 Ci/mmol) wurde von Amersham Buchler gekauft.

Szintillator

KONTROGEL der Fa. KONTRON

Säulenmaterial

Whatman P-11 Phosphocellulose wurde über PIERCE bezogen.
 Hydroxylapatit wurde als Bio-Gel bei BIO-RAD gekauft.

Chemikalien

Sonstige Chemikalien wurden von MERCK gekauft.

II. 2. Spezielle Methoden

2. 1. Isolierung und Charakterisierung von DNA

Isolierung von Soma DNA aus Kernen des Darms von Ascaris suum
 Därme von adulten Ascaris-Männchen wurden präpariert, sorgfältig in TES gewaschen, insbesondere alle evtl. anhaftenden Gonadenfragmente entfernt. Nach mehrmaligem sorgfältigen Waschen wurden die Därme im Potter S homogenisiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 3500 Rpm und 0° C im Rotor HB-4 wurden Kerne in 30 ml Corex-Röhrchen pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Nach zwei derartigen Waschschritten wurden die Kerne durch Zugabe von SDS (1%) lysiert und mit Proteinase K (50 µg/ml) bei 41 °C über Nacht inkubiert. Nach einer vorsichtigen Extraktion mit Phenol wurde die DNA mit Äthanol gefällt. Die DNA wurde anschließend über einen neutralen CsCl-Gradienten (mittlere Startdichte ρ = 1.72 g/ml, Rotor Ti 50, 40 000 Upm für 36 h) gereinigt.

Isolierung von keimbahnbegrenzter DNA aus männlichen Gonaden von *A. suum*

Testes aus adulten Männchen von *A. suum* wurden präpariert, sorgfältig in TES gewaschen und anschließend eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde mit einer Rasierklinge möglichst fein zerkleinert und durch Zugabe von SDS (1 %) lysiert. Nach Proteinase K-Verdau (50 µg/ml) über Nacht und Phenolextraktion wurde die DNA in einem CsCl/Hoechst 33258-Dichtegradienten (mittlere Startdichte $\rho = 1.72$ g/ml, Rotor Ti 50, 40 000 Upm für 24 h und 37000 Upm für 12 h) aufgetrennt. In Gegenwart von Hoechst 33258 (1 µg/3 µg DNA) wird eine Abtrennung der Satelliten-DNA als diskrete Bande erreicht. Diese Bande wurde separat abgenommen. Der Farbstoff wird durch Extraktion mit Phenol entfernt.

Isolierung von Plasmid-DNA in superhelikaler Form

Superhelikale Plasmid-DNA wurde nach der Alkali-SDS-Lyse-Prozedur (Maniatis et al. 1982) gewonnen. Abtrennung kontaminierender Nukleinsäuren wurde entweder durch Zentrifugation im EtBr/CsCl-Dichtegradienten oder durch Reinigung der DNA mittels Ausschlußchromatographie über Bio-Gel A-5m (BIO-RAD) erreicht (Crouse et al. 1983).

Konstruktion von Plasmid pAs 6

Keimbahnbegrenzte DNA von *Ascaris suum* wurde mit Bcl I partial verdaut. Die entstehenden DNA-Fragmente wurden auf einem 1.5 % Agarosegel aufgetrennt, das Hexamer der repetitiven Einheit (738 bp, vgl. Roth & Moritz 1981) wurde isoliert. Nach Ligation in pBr 322-DNA, die mit Bam H I linearisiert worden war, wurden mit dem Ligationsansatz Zellen des *E. coli*-Stammes HB 101 transformiert. Durch Hybridisierung mit ³²P-markierter kb sat DNA wurde die Homologie der klonierten DNA zur kb sat DNA nachgewiesen. Die Authentizität des Inserts im Plasmid pAs6 wurde durch Restriktionsanalyse bestätigt (siehe Abschnitt III. 3. 1.).

Fraktionierung von DNA-Fragmenten mittels eines Sucrosegradienten

endo/Hind III-verdaute DNA (ca. 20 µg) wurde in 100 µl 1/10 TES auf einen Gradienten aus Sucrose in 1/10TES (10 - 50 %) aufgetragen. Durch Zentrifugation im Rotor SW 60 wurde die DNA aufgetrennt. Nach Beendigung der Zentrifugation (35 000 Upm für 14 h) wurde das Röhrchen ausgetropft, es wurden 40 Fraktionen a 100 µl geschnitten. Die Fragmentgröße der in den einzelnen Fraktionen vorhandenen DNA wurde durch Elektrophorese von 10 µl-Aliquots auf 0.8 % Agarose bestimmt. Die Fraktionen, in denen nur DNA-Fragmente einer Länge von weniger als ca. 2 kb vorlagen, wurden vereinigt und in dem in Kap. III. 3. 3. 1. beschriebenen Experiment eingesetzt.

3'-Endmarkierung von DNA durch Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I

100 -1000 ng geeigneter Restriktionsfragmente wurden in 10 -50 µl Reaktionsvolumen durch 1 -3 U Klenow Polymerase in 30 min bei RT endmarkiert. Die Markierung erfolgte durch Zusatz von 5 -50 µCi (entsprechend 1.5 - 15 pmol) entweder ³²P- dATP (für Enden, die mit Eco R I, Hind III bzw. Hinf I erzeugt worden waren) oder ³²P-dGTP (für Cla I-Enden).

Markierung von DNA durch Nicktranslation

In ca 1 µg DNA wurden in 100 µl Reaktionsvolumen in NT-Puffer durch Zugabe von 10 ng/ml DNase I Einzelstrangbrüche eingeführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von ³²P-dATP sowie 10 U DNA-Polymerase I markiert. Die Reaktion wurde nach 90 min durch Zugabe von 20 mM EDTA unterbrochen, die DNA durch Isopropanol gefällt und anschließend in aqua bidest. gelöst.

5'-Endmarkierung von DNA durch Polynucleotidkinase

Geeignete Restriktionsfragmente (50-200 ng) wurden durch Inkubation mit 1-10 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm für 60 min bei 37°C dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym

inaktiviert (10 min, 68° C) und durch Phenolextraktion abgetrennt. Die DNA wurde in PNK-Puffer gelöst und in 10 µl mit 10 µCi ^{32}P -γ-ATP und 3 U Polynucleotidkinase 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Abtrennen der nicht inkorporierten Nukleotide über Sephadex G-50 wurde die DNA gefällt.

Abbau von DNA mit Exonuclease Bal 31

20 bis 50 µg Soma DNA wurden in 200 bis 400 µl Bal 31-Puffer mit 3 -10 U Bal 31 bei 30° C abgebaut. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots a 40 µl entnommen. Der DNA-Gehalt der Proben wurde nach Zugabe von 2 ml Hoechst 33258-Lösung durch Messung der Fluoreszenz (Anregung bei 350 nm, Emission bei 450 nm) im KONTRON-Fluorometer UVIKON 810 ermittelt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mittels DNA-Standards bekannter Konzentration ermittelt. Weitere Aliquots der einzelnen Proben wurden nach der Methode von Kafatos et al. (1979) auf Nitrocellulosefilter aufgetragen und mit ^{32}P -markierter kb sat DNA hybridisiert. Die an die Filter gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (KONTRON Betamatic) bestimmt.

Verdau von Chromatin mit Micrococcus-Nuclease

Därme und männliche Gonaden wurden präpariert wie beschrieben. Das Gewebe wurde im Potter S homogenisiert, wobei zu den dicht gepackten Därmen ein Volumen 1/10 TES zugegeben wurde; anschließend wurden, wie oben beschrieben, durch Zentrifugation die Kerne angereichert. Nach mehreren Waschungen in TES und einer Waschung in Nuclease-Inkubationspuffer wurden die gereinigten Kerne in 1 Volumen Nuclease-Inkubationspuffer suspendiert. Die Kernsuspension wurde mit Micrococcus-Nuclease (10 U/ml) versetzt und für 1, 3, 10, 30 bzw. 60 min bei 37 °C inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Aliquot entnommen, mit SDS (1 %) 10 min bei 55° C lysiert und über Nacht mit Proteinase K inkubiert. Daraufhin wurde die DNA mit Phenol extrahiert und nach Äthanol-fällung auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt.

Embryonen im 100-Zellenstadium wurden ebenfalls im Potter S nach Zugabe von 1 Volumen 1/10 TES homogenisiert. Zur

Abtrennung der Eischalen wurde die Kernsuspension in 30 ml Corex-Röhrchen mit einem Kissen von 0.24 M Sucrose in 1/10 TES unterschichtet. Durch schwache Zentrifugation (Rotor HB-4, 500 Upm für 3 min) lassen sich die Kerne relativ gut pelletieren, während die Schalenüberreste im wesentlichen im Überstand verbleiben.

Im Anschluß an die Abtrennung der Schalen wurden die Kerne durch Zentrifugation in TES dreimal gewaschen und weiterverarbeitet, wie oben für Kerne aus Darm und männlichen Gonaden beschrieben .

Verdau von Restriktionsfragmenten mit der Nuclease S₁

Ca. 5 ng (ca. 10 000 cpm) der 3'-markierten endo/Hinf I-Fragmente wurden in 10 µl S₁-Inkubationspuffer mit 0 U, 2 U bzw. 20 U S₁-Nuclease für 30 min bei 37° C verdaut. Anschließend wurde die DNA gefällt, gelöst in 3 µl Formamidmix und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Southern blotting-Technik

DNA wurde aus Agarosegelen nach der Methode von Southern (1975) auf Nitrocellulosefilter (6 x 12 cm) transferiert. Die Filter wurden in verschließbare Zentrifugenröhrchen gesteckt und in einem Inkubator mit Drehvorrichtung im Hybridisierungsmix für 4 h bei 68° C vorhybridisiert. Danach wurde die radioaktiv markierte DNA durch Kochen (10 min) denaturiert und zu den Filtern gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68° C in möglichst geringem Volumen (ca. 4 ml). Die Filter wurden wie folgt gewaschen: 2 x 5 min in 2xSSC; 2x 10 min in 2 x SSC/1 x Denhardt bei 68 °C; 2x 15 min in 2 x SSC/0.5 % SDS bei 68° C; 2 x in 2 x SSC bei RT.

Elektrophoresetechniken

Agarosegel-Elektrophorese wurde in TEB-Puffer durchgeführt. Zum Nachweis aller auftretenden Plasmid-DNA-Spezies, insbesondere der verschiedenen Topoisomere, wurde die Elektrophorese wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde die Elektrophorese 12 h ohne

Ethidiumbromid bei 2 V/cm durchgeführt, dann wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) für 30 min gefärbt, 60 min entfärbt und die Elektrophorese bei 6 V/cm für 3 h fortgesetzt. Im ersten Schritt werden lineare Moleküle und sc-DNA von kovalent geschlossenen, entspannten Ringen getrennt, die zunächst mit der oc-DNA gleichauf laufen. Die Unterscheidung zwischen oc-DNA und kovalent geschlossenen entspannten Ringen gelingt im zweiten Schritt: In Gegenwart von 1 µg/ml Ethidiumbromid bilden die kovalent geschlossenen Ringe positive 'supercoils' aus (Wang 1982) und laufen dadurch in der Elektrophorese schneller als die oc-DNA, die keine positiven 'supercoils' ausbildet. Alternativ zur Färbung mit EtBr wurden Gele mit Silber nach der Methode von Merrill et al. (1982) gefärbt. Zur Photographie wurde Agfapan 400 benutzt.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt. Denaturierende Gele enthielten zusätzlich 7 M Harnstoff. Vor dem Auftragen auf native Gele wurden die Proben mit 1/5 Vol Stoppuffer versetzt und für 10 min bei 55° C inkubiert. Vor dem Auftragen auf denaturierende Gele wurden die Proben durch Fällung oder Lyophilisierung in einem BECKMAN Mikrorotationsverdampfer des Typs "SpeedVac" wasserfrei gemacht und in 6 µl Formamidmix gelöst sowie 10 min bei 100 ° C denaturiert. Denaturierende Gele (20 x 55 cm) wurden durch Vorelektrophorese bei 65 W auf 65° C aufgeheizt, die Elektrophorese wurde bei ca. 42 W durchgeführt, so daß die Temperatur konstant auf 60° C gehalten wurde. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Plastikfolie (SARANWRAP) bedeckt und mit einem Röntgenfilm (Kodak Xomatic S) exponiert (in der Regel reichten 24 h Exposition aus, wenn pro Gelspur etwa 10 000 cpm aufgetragen waren).

2. 2. Reinigung und Charakterisieren von enzymatischen Aktivitäten

Isolierung der DNA-Topoisomerase I

In verschiedenen Experimenten wurden 1 - 3.5 ml gepackter Eier (ca. $1-3 \times 10^7$ Eier) im Vier- bis Achtzellenstadium in 2 - 8 ml Extraktionspuffer im Potter S homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Kissen von 10 % Sucrose im gleichen Puffer aufgetragen. Durch schwache Zentrifugation (500 Rpm) lassen sich die Schalen pelletieren, wobei Kernfragmente und evtl. noch verbliebene intakte Kerne im Überstand bleiben. Im Anschluß daran wird das Homogenat erneut im Potter S aufgeschlossen, wobei evtl. noch verbliebene intakte Kerne zerstört werden. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation in 30 ml Corex-Röhrchen im Rotor HB-4 (11 000 Rpm, 4° C, 30 min) abgetrennt. Chromatin wurde durch Zugabe von 0.8 % Polymyxin P und Inkubation auf Eis für 30 min präzipitiert und durch Zentrifugation (HB-4, 8000 Rpm bei 4° C für 15 min) abgetrennt. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts vergleichbarer Aliquots von Niederschlag und Überstand wurde die Effizienz des Schrittes kontrolliert. Dem klaren Überstand wurden 2.9 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugefügt. Nach dreistündiger Inkubation auf Eis unter ständigem Rühren wurde durch Zentrifugation (HB-4, 8000 Rpm, 4° C, 30 min.) ein Proteinniederschlag gewonnen. Dieser wurde in 10 - 30 ml Puffer A gelöst und auf eine Whatman P-11 Phosphocellulose-Säule (Bettvolumen 5-15ml) aufgetragen. Nach Waschen mit fünf Säulenvolumen Puffer A wurde die Säule durch einen Stufengradienten von KCl in Puffer A eluiert. Die Elution erfolgte mit 0.4, 0.8, 1.4 und 2.0 M KCl, wobei jeweils mindestens fünf Säulenvolumen aufgetragen wurden. Die Elution wurde durch Absorptionsmessung bei 253 nm im Durchflußphotometer (LKB) kontinuierlich registriert. Einzelne Fraktionen wurden bei 280 nm in einem BECKMAN Spektralphotometer Acta C III nachgemessen. Die 0.8 M KCl-Fraktion der Phosphocellulose-Säule wurde auf eine Hydroxylapatit (HAP)-Säule (Bettvolumen 1-5 ml) aufgetragen. Diese wurde durch einen Kaliumphosphat-Gradienten der Molaritäten 0.02 M, 0.2 M, 0.5 M und 1.0 M KP eluiert. Für die Bindungsexperimente wurden die erhaltenen Fraktionen durch

Dialyse gegen 50 % PEG sowie Dialyse gegen 50 % Glyzerin in Puffer A etwa um Faktor 10 konzentriert.

Test auf Topoisomeraseaktivität

Proben von 1-5 µl der Fraktionen wurden in 40 µl Topoisomerasepuffer mit 0.5 µg sc-DNA für 45 min bei 37 ° C inkubiert. Durch Elektrophorese in 0.8 % Agarose wurden die Reaktionsprodukte nach Inkubation in Stoppuffer (10 min, 55° C) aufgetrennt.

Erzeugung der Endonucleaseaktivität

0.5 ml der 0.5 M HAP-Fraktion wurden über Nacht gegen Puffer A, dem 7mM MET zugestzt waren, dialysiert. Aliquots des Dialysats wurden durch Inkubation mit supercoil-DNA im Topoisomerasepuffer auf Enzymaktivität geprüft.

Kartieren von Endonucleaseschnittstellen

Nach Inkubation mit der Endonuclease wurde die DNA mit Phenol extrahiert, gefällt und mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut.

Isolierung von Topoisomeren einheitlicher superhelikaler Dichte

Supercoil-DNA des Plasmids pUC 7 wurde in 300 µl Topoisomerasepuffer mit 30 U DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus in Gegenwart von Ethidiumbromid (0.85 µg/ml) partiell entspannt. Das resultierende Gemisch von Topoisomeren unterschiedlicher Windungszahl wurde durch Elektrophorese im 0.8 % Agarosegel aufgetrennt (24 h bei 1 V/cm). Die den einzelnen Topoisomeren entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gelstückchen in einem Dialyseschlauch elektroeluiert (Hsieh & Brutlag 1980).

2. 3. DNA-Protein-Bindungstests

Nachweis von DNA-Protein-Komplexen durch Gelelektrophorese

pAs 6 DNA wurde mit Hae III verdaut, die DNA wurde anschließend durch Phenolextraktion gereinigt. 50 ng der Restriktionsfragmente wurden in 20 µl Bindungspuffer mit 2 µl der 10fach konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion für 30 min

bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 % Ficoll in Bindungspuffer wurde die DNA auf ein 7 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese (4 h, 10 V/cm) wurde das Gel durch Silberfärbung angefärbt. In einem weiteren Experiment wurden 500 ng Hae III Fragmente von pAs6 mit 10 µl der konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion im Bindungspuffer inkubiert und wie beschrieben der Elektrophorese unterzogen. In diesem Falle wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt.

Präzipitation von DNA-Protein-Komplexen durch Polyäthylenglykol

Je 3 µg λ-DNA bzw. hochmolekulare kb sat DNA von Ascaris suum wurden im Bindungspuffer mit 50 µl der konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion für 30 min bei RT inkubiert (Gesamtvolumen 80 µl). Danach wurden 20 µl einer 25 % PEG-Lösung zugefügt. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde der Ansatz über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf Mikrozentrifuge (4° C, 15 min) wurde der Überstand abgenommen, der Niederschlag wurde in 30 µl 0.2 M NaCl, 20 mM KP aufgenommen. Um eventuell an die DNA gebundene Topoisomerase abzulösen, wurde der suspendierte Niederschlag mit Ultraschall behandelt (Prell & Vosberg, 1980). 15 µl des Überstandes und 10 µl des Niederschlages wurden auf Topoisomeraseaktivität getestet.

Nachweis von Z-DNA durch anti-Z-Antikörper

0.5 µg Plasmid-DNA wurden in 30 µl Triäthanolamin-Puffer für 30 min mit 1 µl des Antikörpers D-11 (Geschenk von F. Pohl) inkubiert. Anschließend wurde eine Elektrophorese in 0.8 % Agarose durchgeführt; das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) gefärbt.

III. Ergebnisse

1. Organisation der im Soma verbleibenden Kopien der hochrepetitiven keimbahnbegrenzten Satelliten-DNA

1.1. Restriktionsanalyse der soma sat DNA

Zunächst wurde die Sequenzorganisation der im Soma verbleibenden Satelliten-DNA durch Verdau von Soma-DNA mit verschiedenen Restriktionsnucleasen und anschließender Southern-blot-Analyse untersucht. Soma-DNA aus Därmen wurde mit Eco RI verdaut, ein Aliquot des Abbaus wurde anschließend mit Alu I verdaut. Beide Enzyme spalten nur sehr wenige der in der Keimbahn vorhandenen Kopien der repetitiven Einheit der kb sat DNA (Roth & Moritz 1981 und eigene Beobachtung). Die DNA wurde in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter transferiert (Southern 1975). Die immobilisierte DNA wurde mit ^{32}P -markierter kb sat DNA hybridisiert. Während die Masse der Soma-DNA durch Eco RI und Alu I in Fragmente erwarteter Größe (um 4 kb durch Eco RI, kleiner als 500 bp durch den Doppelverdau) gespalten wird (Abb. 1 A), liegt die soma sat DNA nach Eco R I-Verdau in Fragmenten von ca. 7- 20 kb vor. Nachspaltung mit Alu I verringert die Größe dieser Fragmente auf ca. 2-15 kb (Abb. 1 B).

Aus diesem Ergebnis lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Unter Berücksichtigung der Befunde von Roth & Moritz (1981), wonach die Kopien tandemartig, d. h. ohne etwaige "spacer", angeordnet sind, zeigt sich, daß die soma sat DNA in großen Blöcken geclustert vorliegt. Die Größe dieser Cluster ist nicht einheitlich, sondern variiert zwischen ca. 2 kb und 15 kb. Die nach Eco R I-Verdau in den Fragmenten noch enthaltene DNA, die aus nicht hybridisierungsfähigen Sequenzen besteht, wird durch Alu I-Verdau in erwarteter Weise abgebaut. Zu der Größe der Alu I/Eco R I-Fragmente dürfte sie also weniger als 500 bp beitragen.

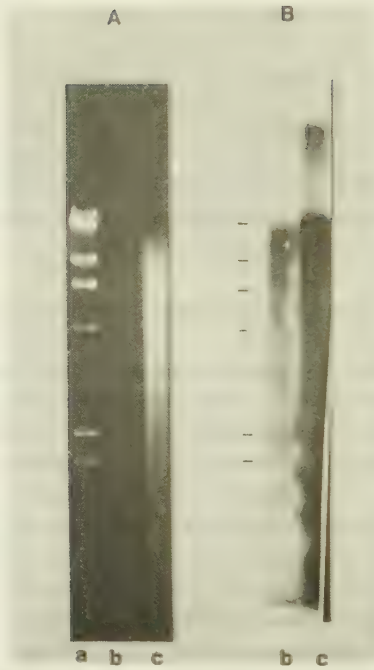


Abb. 1: Restriktionsanalyse der im Soma verbleibenden Satelliten-DNA.

A. Soma-DNA aus Zellkernen von Därmen wurde mit Eco RI verdaut (c). Ein Aliquot wurde mit Alu I nachgespalten (b). (a) Hind III-Fragmente von λ -DNA. Die Elektrophorese wurde sehr lange fortgesetzt, um eine hohe Auflösung im Bereich der hochmolekularen Fragmente zu erhalten. Deshalb sind die durch den kombinierten Abbau (b) erzeugten niedermolekularen Fragmente (um 500 bp) in diesem Gel nicht mehr darstellbar. B. Die DNA aus dem Gel in Abb 1 A wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit ^{32}P markierter Kb sat DNA hybridisiert. Die Positionen der Hind III-Fragmente von λ -DNA (23 kb, 9.4 kb, 6.7 kb, 4.4 kb, 2.3 kb, 2.0 kb) sind durch Striche angegeben. Im Genom der Darmzellen gibt es Cluster von soma sat DNA einer Groe zwischen ca. 3 und 15 kb.

1.2. Hypersensitivität der soma sat DNA gegen Exonuclease Bal 31

Telomernahe DNA kann durch Verdau mit der Exonuclease Bal 31 (Gray 1975) identifiziert werden, wobei endständige DNA durch Bal 31-Hypersensitivität nachgewiesen wird (Dawson & Herrick, 1984). Hochmolekulare Soma-DNA aus Därmen wurde durch die Exonuclease Bal 31 degradiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und durch Zugabe von 10 mM EDTA die Reaktion unterbrochen. Aliquots der Proben wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2 A) und die DNA auf Nitrocellulose transferiert. Das Filter wurde mit ^{32}P -markierter Satelliten-DNA hybridisiert (Abb. 2 B). Durch dieses Experiment wird gezeigt, daß die großen Blöcke der soma sat DNA durch Inkubation mit der Exonuclease Bal 31 mit ähnlicher Kinetik verkleinert werden wie die Fragmente der Gesamt-DNA (Vgl. Diskussion S. 63).

In einem weiteren Experiment wurde die Soma-DNA nach Bal 31-Abbau quantitativ analysiert: Zunächst wurde für jeden Zeitpunkt die Gesamtmenge der DNA in einem Aliquot fluorometrisch bestimmt, daraus ergibt sich die Kinetik des enzymatischen Abbaus (Abb. 3, Kurve O). Weiterhin wurde ein Aliquot jeder Probe auf Nitrocellulose aufgetragen und gegen ^{32}P -markierte Satelliten-DNA hybridisiert (Kafatos et al. 1979). Nach Autoradiographie wurde das Nitrocellulosefilter zerschnitten und für jeden Punkt die gebundene Radioaktivität bestimmt. Daraus ergibt sich die Kinetik des Abbaus von Satelliten-DNA im Somagenom (Abb. 3, Kurve ●). Aus dem Vergleich der Kurve des Abbaus von Gesamt-DNA mit dem Verlauf der Degradation von Satelliten-DNA ergibt sich, daß etwa 35% der im Soma verbliebenen Satelliten-DNA Hypersensitivität gegen die Exonuclease Bal 31 zeigt; der Rest dieser DNA wird mit nahezu gleicher Geschwindigkeit abgebaut wie die Gesamt-DNA. Da Hypersensitivität gegen die Exonuclease Bal-31 ein Indiz für chromosomenendständige Sequenzen ist (Van der Ploeg et al. 1984), ergibt sich, daß bei A. suum zumindest ein Teil der im Soma verbleibenden Satelliten-DNA in der Nähe der Soma-Telomere liegt (Näheres siehe Diskussion).

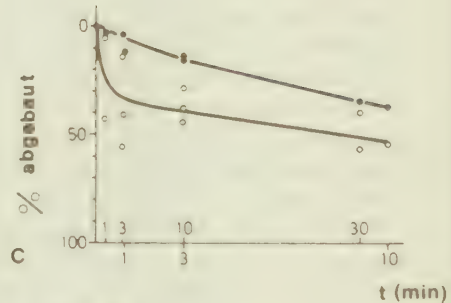
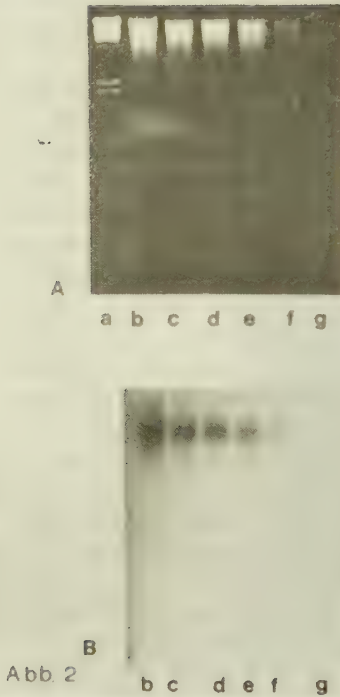


Abb 3

Abb. 2: Abbau von Soma-DNA mit Exonuclease Bal 31
A. Soma DNA aus Zellkernen von Därsen wurde mit Bal 31 abgebaut für (b) 0 min, (c) 1 min, (d) 3 min, (e) 10 min, (f) 30 min bzw. (g) 60 min. (a) Hind III-Fragmente von λ -DNA. Elektrophorese in 0.8 % Agarose B. Anschließend wurde die DNA auf Nitrocellulosefilter transferiert und mit ^{32}P -markierter kb sat DNA hybridisiert.

Abb. 3: Kinetik des Abbaus von Soma-DNA mit Bal 31
Soma DNA aus Zellkernen von Därsen wurde mit Bal 31 abgebaut. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen. Für jeden Zeitpunkt wurden der DNA- Gehalt (Gesamt-DNA ○) sowie der Gehalt an soma sat DNA (●) bestimmt. Die Kurve fasst das Resultat von drei unabhängigen Experimenten zusammen. Das Experiment zeigt, daß ca. 35 % der soma sat DNA Hypersensitivität gegenüber der Exonuclease zeigen.

1. 3. Untersuchung der Chromatinorganisation

Beim Ciliaten Oxytricha konnte gezeigt werden, daß die DNA in unmittelbarer Nachbarschaft des Chromosomenendes nicht in der üblichen nucleosomalen Organisation vorliegt, sondern durch Assoziation mit speziellen Telomerproteinen einen Komplex ausbildet, der durch Abbau mit Micrococcus-Nuclease nachgewiesen werden kann (Gottschling & Cech 1984). Im folgenden Experiment wurde die Frage untersucht, ob in somatischen Kernen aus A. suum die Chromatinorganisation der Kopien der soma sat DNA sich von derjenigen der Gesamt-DNA unterscheidet, ob also für die soma sat DNA ein spezieller Verpackungstyp nachgewiesen werden kann.

Zur Untersuchung der Chromatinorganisation der im Soma verbleibenden Satelliten-DNA von A. suum wurde Chromatin aus Därmen in einer Zeitkinetik mit Micrococcus-Nuclease verdaut. Als Kontrolle wurde Chromatin aus männlichen Gonaden sowie aus Vielzellern (Embryonen im ca. 100 Zellen-Stadium) gewonnen und ebenfalls mit Micrococcus-Nuclease abgebaut. Nach dem Verdau wurde die DNA isoliert und nach der Elektrophorese in 2% Agarose (Abb. 4 A) auf Nitrocellulose transferiert. Die Filter wurden mit ^{32}P -markierter kb sat DNA hybridisiert (Abb. 4 B). Die Größe der Mononucleosomen im Darmchromatin wurde zu 180 bp bestimmt, während ein Nucleosom aus Gonaden 175 bp DNA enthält. Beide Typen sind also nahezu gleich groß. Durch Hybridisierung mit ^{32}P -markierter kb sat DNA konnte gezeigt werden (Abb. 4 B), daß diejenigen Nucleosomen, die Satelliten-DNA enthalten, in Soma und Keimbahn gleich groß sind und ebenfalls je ca. 180 bp DNA enthalten. Auch in Embryonen im 100-Zellenstadium ist kein abweichender Nucleosomentyp nachweisbar (Abb. 4 B, Spur b). In Abb. 1 wird gezeigt, daß bei A. suum große Cluster der soma sat DNA, die ca. 30 bis 150 Kopien der repetitiven Einheit enthalten, an den Enden der somatischen Chromosomen lokalisiert sind. Deshalb könnte ein telomerischer Komplex, analog zu dem in Oxytricha nachgewiesenen, durch Analyse mittels Micrococcus-Nuclease und Southernblot dann nicht gefunden werden, wenn nur die letzten DNA-Abschnitte der Chromosomen an diesem Komplex beteiligt sind, während die restlichen Kopien der soma sat DNA in Nucleosomen herkömmlicher Größe verpackt

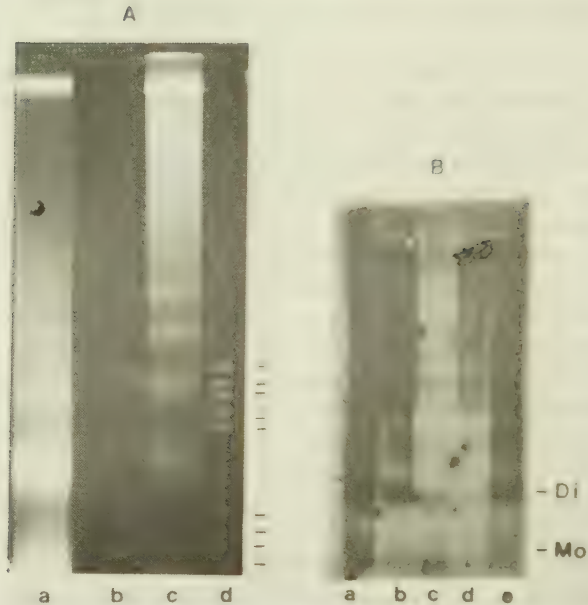


Abb. 4: Verdau von Chromatin mittels *Micrococcus-Nuclease*. Chromatin aus Därmen sowie aus Gonaden wurde mit *Micrococcus-Nuclease* verdaut. Aus einer Versuchsreihe mit variabler Inkubationszeit wurden jeweils Proben ausgesucht, in denen der Abbau etwa gleich weit vorangetrieben war. Die DNA eines Aliquots des Verdau von Gonaden Chromatin wurde (a) unverdünnt (ca. 1 μ g DNA) und (b) 1:100 verdünnt (ca. 10 ng DNA) auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Aus dem Verdau von Darm-Chromatin wurde ca 1 μ g DNA aufgetragen (c). (d) Hae III-Fragmente von pBr 322-DNA: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192 bp.

B. DNA (je ca. 10 ng) aus dem in A beschriebenen *Micrococcus Nuclease* Verdau von Gonaden Chromatin (a, e) sowie DNA (ca. 1 μ g) des in A beschriebenen Verdau von Darm-Chromatin wurde auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Weiterhin wurde DNA (ca. 1 μ g) aus einem *Micrococcus-Nuclease*-Verdau von Chromatin aus Vielzellern aufgetragen (b). In Spur (c) wurde DNA (ca. 1 μ g) aus einem sehr weit fortgeschrittenem *Micrococcus-Nuclease* Verdau von Darm-Chromatin aufgetragen. Die DNA wurde auf Nitrocellulose transferiert und mit 32 P markierter kb sat DNA hybridisiert. Die Positionen des Nucleosomen-Monomers bzw. -Dimers sind angegeben. Die in den Nucleosomen des Soma-Chromatins enthaltenen Fragmente sowohl der kb sat DNA wie auch der 'single copy' DNA haben eine einheitliche Länge. Ebenso konnte in der Chromatinorganisation kein Unterschied zwischen der kb sat DNA in der Keimbahn und den im Soma verbleibenden Kopien dieser DNA nachgewiesen werden.

sind. Auch die Analyse sehr limitierter Micrococcus-Nuclease-Abbauteile ergab jedoch keine Anhaltspunkte auf abweichende Chromatinorganisation der soma sat DNA (nicht dargestellt). Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, daß sich ein telomerischer DNA-Protein-Komplex bei A. suum, so er existiert, durch Hybridisierungsexperimente mit markierter kb sat DNA nachweisen läßt.

1. 4. Test auf potentielle Z-DNA-Konformation

Da nach unserer Arbeitshypothese eine besondere DNA-Konformation Voraussetzung für die Diminution ist, andererseits über Beteiligung von Z-DNA an Telomerbildung bei Hefe spekuliert wird (Walmsley et al. 1983), und eine Beteiligung von Z-DNA-Intermediaten bei in vitro- Studien über allgemeine Rekombination bei Ustilago nachgewiesen wurde (Kmiec et al. 1985), wurde die Frage geprüft, ob kb sat DNA aus A. suum in Z-Konformation vorliegen kann.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die kb sat DNA von A. suum in supercoil-DNA in Z-Konformation übergehen kann. Dazu wurde klonierte kb sat DNA (zur Klonierung siehe S. 11 und S. 33) mit einem für Z-DNA spezifischen Antikörper inkubiert. Der monoklonale Antikörper D-11 erkennt in vitro Z-DNA (F. POHL, pers. Mitteilung), wie in einem Kontrollexperiment mit dem Plasmid pFP 32 verifiziert wurde: Durch den Antikörper wird die elektrophoretische Mobilität von supercoil-DNA dieses Plasmids, welches ein 32 bp-Insert von (GC)₁₆ enthält, verringert. Als negative Kontrolle wurde supercoil-DNA von pBr 322 eingesetzt. Das Experiment (Abb. 5) zeigt, daß unter Bedingungen, in denen pFP 32 vom Antikörper gebunden wird, supercoil-DNA von pAs 6 keinerlei Affinität zu dem Antikörper besitzt. Die kb sat DNA aus Ascaris ist also nicht fähig, in vitro Z-DNA auszubilden. Einschränkend muß dazu gesagt werden, daß möglicherweise die Spezifität des Antikörpers für poly(GC) in Z-Konformation höher ist als für eine davon abweichende Sequenz, auch wenn diese durchaus in Z-Konformation vorliegt.

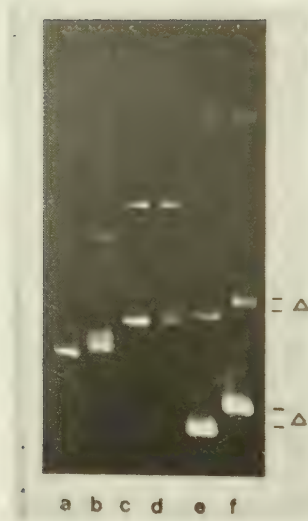


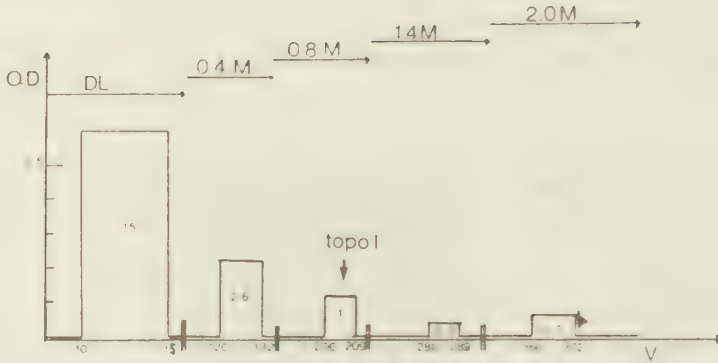
Abb. 5: Untersuchung der kb sat DNA auf Affinität zum anti-Z-DNA-Antikörper D-11
 Supercoil-DNA der Plasmide pBr 322 (a, b), pAs 6 (c, d) und pFP 32 (e, f) wurde ohne Antikörper (a, c, e) bzw. mit dem Antikörper D-11 (b, d, f) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt. Durch Inkubation mit dem Antikörper wird supercoil DNA sowohl des pFP 32-Monomers wie auch des pFP 32-Dimers in der Elektrophorese verlangsamt (Differenz mit Δ bezeichnet). Mit pBr 322 ist ein Verzögerungseffekt, wenn überhaupt, nur bei einem Teil der Moleküle zu erkennen, das Laufverhalten der pAs 6 supercoil-DNA ist nahezu unverändert.

2. Isolierung von DNA-adressierten Enzymen aus diminutionsbereiten Entwicklungsstadien

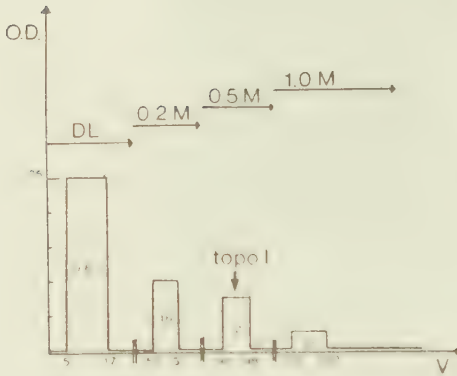
Aus 1-3.5 ml Eiern im Vier- bis Achtzellenstadium wurden Rohextrakte gewonnen (wegen der mangelnden Synchronie der Eier enthielten die Ansätze lediglich ca. 60 % Vier- bis Achtzeller, während der Rest der Eier im wesentlichen als Zwei- bis Dreizeller vorlag). Die genaue Zusammensetzung jeder Probe wurde durch Auszählen von Stichproben bestimmt, ein systematischer Einfluß der insgesamt geringen Schwankungen auf die Enzymaktivitäten war nicht nachzuweisen. Nach Abtrennen der Nukleinsäuren durch Fällung mit Polymin P wurden die Proteine aus dem Extrakt durch Ammoniumsulfat gefällt. Bei dieser Prozedur werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Hydratation sowie der verwendeten Ammoniumsulfatkonzentration differentiell gefällt. Unter den vorliegenden Bedingungen (70 % Sättigung mit Ammoniumsulfat) dürfte der größte Teil der Proteine ausgefällt worden sein (Aebi 1971, S. 186 ff). Der Niederschlag wurde gelöst und über eine Phosphocellulosesäule fraktioniert (Hsieh & Brutlag 1980), wobei mit einem KCl-Stufengradienten eluiert wurde (Abb. 6 A). Der Rohextrakt sowie die Fraktionen wurden durch Inkubation mit supercoil-DNA auf DNA-adressierte Enzyme untersucht.

2. 1. Isolierung von DNA-Topoisomerase I

In der 0.8 M KCl-Fraktion der Phosphocellulose-Chromatographie konnte eine DNA-Topoisomeraseaktivität nachgewiesen werden. Supercoil-DNA wird durch diese Aktivität entspannt, wobei bei unvollständiger Reaktion Topoisomere unterschiedlicher superhelikaler Dichte als Intermediate nachweisbar sind (Abb. 7 A). Die 0.8 M KCl-Fraktion wurde mittels HAP-Chromatographie fraktioniert. Dabei wurde ein Stufengradient aus Kaliumphosphat (KP) appliziert (Abb. 6 B). Der Verlauf der Reinigung der topo I aus 3.5 ml Eiern ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Die Absorption bei $\lambda = 280$ nm



A



B

Abb. 6: Säulenchromatographische Reinigung der DNA-Topoisomerase I.

A. Phosphocellulose-Chromatographie. Die Fraktionen mit O.D.260 wurden für jeden Elutionsschritt (KCl-Konzentration in mol/l ist angegeben) vereinigt und die O.D.280 bestimmt. Die Gesamt-O.D.280 jeder Fraktion ist angegeben. Auf der Abszisse ist das gesamte Elutionsvolumen in ml angegeben. In der 0.8 M KCl-Fraktion befindet sich die Topoisomeraseaktivität, die anderen Fraktionen sind frei davon.

B. HAP-Chromatographie. Die 0.8 M KCl-Fraktion der Phosphocellulosesäule wurde mittels HAP-Chromatographie fraktioniert. Die Darstellung entspricht derjenigen der Abb. 6 A, die Kaliumphosphat Konzentration jedes Elutionsschritts ist in mol/l angegeben.

des Extrakts beträgt nach Ausfällen des Chromatins $O.D._{280} = 28$. Die DNA-Topoisomerase eluiert von der HAP-Säule bei 0.5 M KP (Abb. 7 A). Die 0.5 M HAP-Fraktion weist noch eine Gesamt- $O.D._{280} = 0.12$ auf. Während also der Proteingehalt der 0.5 M HAP-Fraktion etwa um Faktor 200 niedriger ist als im Rohextrakt, ergibt eine Abschätzung der Enzymaktivitäten, daß vergleichbare Aktivitäten im Rohextrakt und in der 0.5 M HAP-Fraktion vorliegen (nicht dargestellt).

Die gereinigte topo I-Aktivität wurde mit einem isolierten Topoisomer von pUC 7-DNA, das 4 superhelikale Windungen enthielt, inkubiert. Dabei ergab sich, daß das Enzym superhelikale Windungen in Einerschritten entfernt, erkennbar am Auftreten jedes der drei möglichen Intermediate während der Entspannungsreaktion (Abb. 7 B). Es handelt sich also um eine Typ I-Topoisomerase (Gellert 1981).

2. 2. Gewinnung einer Endonucleaseaktivität

In Gegenwart von β -Mercaptoäthanol (1 mM im Extraktionspuffer) ist bereits im Rohextrakt eine Aktivität nachweisbar, die lineare DNA aus supercoil-DNA erzeugt. Diese Aktivität eluiert von der Phosphocellulosesäule bei 0.8 M KCl, also mit der DNA-Topoisomerase. Auch in Versuchen mit kontinuierlichen KCl-Gradienten eluierte diese Aktivität gemeinsam mit der Topoisomerase. In der anschließenden HAP-Chromatographie konnte die Endonucleaseaktivität von der Topoisomerase abgetrennt werden (Abb. 7 A). Läßt man die 0.5 M KP-Fraktion jedoch für längere Zeit bei 4° C stehen, so erscheint nach einigen Tagen in dieser Fraktion ebenfalls nachweisbare Endonucleaseaktivität (vgl. Abb. 7 A Spur c), die mit fortschreitender Alterung zunimmt.

Im Rohextrakt ist keine Endonucleaseaktivität nachweisbar, wenn man den Extraktionspuffer ohne Zusatz von MET verwendet (nicht dargestellt). Alle Lösungen enthalten routinemäßig 1 mM MET (vgl. S. 9). Die Entstehung der Endonuclease-Aktivität könnte also durch Einwirkung von MET bedingt sein. Zur Klärung der Frage wurde in einem Kontrollexperiment eine frisch gewonnene 0.5 M HAP-Fraktion über Nacht gegen Puffer A, dem 7mM MET zugesetzt waren, dialysiert. Die Aktivität der Fraktion

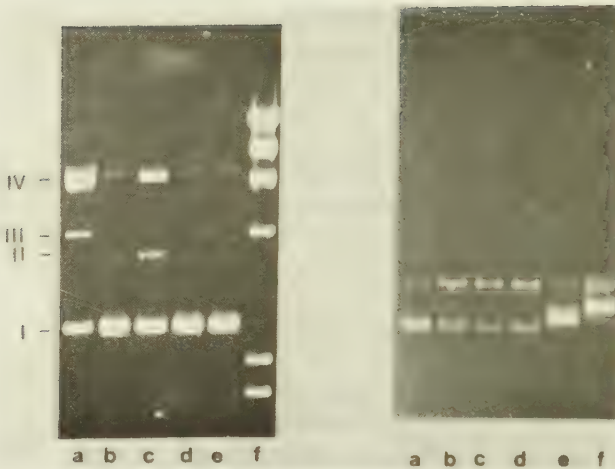


Abb. 7: A. Enzymaktivitäten in HAP-Fractionen. pBr 322-DNA wurde mit einem Aliquot der (a) 0.02 M HAP-Fraktion, (b) der 0.2 M HAP-Fraktion, (c) der 0.5 M HAP-Fraktion, (d) der 1.0 M HAP-Fraktion sowie ohne Enzym (e) inkubiert. (f) Hind III-Fragmente von λ -DNA. I supercoil DNA; II kovalent geschlossene, entspannte DNA; III lineare DNA; IV oc-DNA. Elektrophorese in 0.8 % Agarose zunächst ohne EtBr, dann in Gegenwart von 1 μ g/ml EtBr. In der 0.5 M HAP-Fraktion ist Topoisomeraseaktivität nachweisbar, während in der 0.02 M HAP-Fraktion eine Endonucleaseaktivität auftritt, die lineare und oc-DNA erzeugt.

B. Charakterisierung der DNA Topoisomerase als Typ I Enzym. Aus partiell entspannter pUC 7 DNA wurde das Topoisomer mit vier superhelikalen Windungen isoliert und mit der 0.5 M HAP-Fraktion für (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 15 min sowie (d) 30 min inkubiert. (e) und (f) isolierte Topoisomere mit drei bzw. zwei superhelikalen Windungen. Elektrophorese in 0.8 % Agarose ohne EtBr. Durch Inkubation mit der 0.5 M HAP-Fraktion werden alle drei möglichen Intermediate erzeugt, die Windungszahl wird also in Einzelschritten verringert.

wurde vor und nach der Dialyse getestet (Abb. 8): Es zeigt sich, daß durch die MET-induzierte Aktivität die supercoil-DNA vollständig in oc-DNA und lineare Moleküle umgesetzt wurde. Entspannte Ringe als Topoisomerase-induzierte Reaktionsprodukte sind nicht nachweisbar (Abb. 8 B, vgl. Abb. 13 A). In einem weiteren Kontrolllexperiment wurde die 0.5 M HAP-Fraktion mit 20 mM MET versetzt und auf Eis mehrere Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, deren Aktivität getestet wurde. Es zeigte sich, daß bei fortdauernder Inkubation mit MET die topo I-Aktivität verringert wird, während die Endonucleaseaktivität zunimmt (Abb. 8 C).

Durch die Einwirkung von MET wurde also die DNA-Topoisomerase inaktiviert und ein Endonucleasevorläufer in derselben HAP-Fraktion aktiviert. Da der Endonucleasevorläufer mit der DNA-Topoisomerase eluiert, die Endonuclease selbst dagegen nicht, liegt die Vermutung nahe, daß die Endonuclease aus der Topoisomerase entsteht. Es ist bekannt, daß durch MET Proteine über Zerstörung von Disulfidbrücken in einzelne Polypeptide zerlegt werden (Assoian et al. 1983). Es liegt nahe zu vermuten, daß die Endonuclease eine denaturierte Form der Topoisomerase darstellt, die zur Ausführung einer Partialreaktion noch befähigt ist (vgl. Diskussion).

2. 3. Hinweis auf DNA-Topoisomerase II

In der mit 1.4 M KCl von der Phosphocellulosesäule eluierten Fraktion ist eine schwache DNA-Topoisomerase-Aktivität nachweisbar, die abhängig vom Zusatz von ATP ist (nicht dargestellt). Hierbei könnte es sich um die DNA-Topoisomerase II handeln. Viele eukaryontische Typ II-Topoisomerasen zeigen ATP-Abhängigkeit (Liu 1983). Für eine genauere Untersuchung der Aktivität müßte diese stabilisiert werden, da die aufgewiesene Aktivität sich als sehr schwach und instabil erwies. Die Topoisomerase II ist wahrscheinlich im Chromosomen-"scaffold" verankert, wie z. B. für die Topoisomerase II aus *Drosophila* gezeigt wurde (Earnshaw et al. 1985). Möglicherweise ist der größte Teil der Topoisomerase II-Aktivität aus Ascaris-Embryonen in den hier vorliegenden

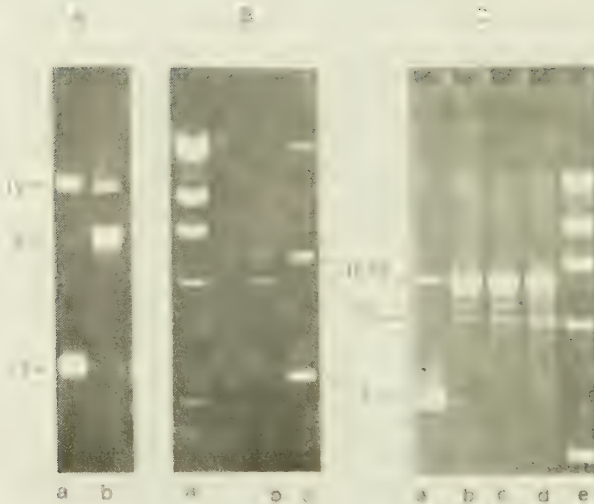


Abb. 8: Erzeugung der Endonucleaseaktivität.

A. pBr 322-DNA inkubiert (b) mit einem Aliquot einer frisch gewonnenen 0.5 M HAP-Fraktion (topo I-Fraktion) und (a) ohne Enzym. Elektrophorese in 0.8 % Agarose zunächst ohne EtBr, dann in Gegenwart von 1 µg/ml EtBr. sc-DNA wird fast gänzlich in kovalent geschlossene, entspannte DNA umgesetzt. B. pBr 322-DNA inkubiert (c) ohne Enzym, (b) mit der topo I-Fraktion, eingesetzt nach Dialyse gegen 7 mM MET über Nacht. (a) Hind III-Fragmente von λ-DNA. Elektrophorese in 0.8 % Agarose ohne EtBr. sc-DNA wird in oc-DNA und lineare DNA umgesetzt, kovalent geschlossene entspannte DNA wird nicht erzeugt. C. Ein Aliquot der 0.5 M HAP-Fraktion wurde auf Eis mit 20 mM MET inkubiert für (b) 0 min, (c) 30 min, (d) 60 min. Anschließend wurde ein Aliquot jedes Ansatzes mit pBr 322-DNA inkubiert. (a) Inkubation von pBr 322-DNA ohne Extrakt. (e) Hind III-Fragmente von λ-DNA. Elektrophorese in 0.8 % Agarose ohne EtBr. Die Topoisomeraseaktivität wird durch die Inkubation mit MET reduziert, erkennbar am früheren Abbruch der Isomerisierungsreaktion unter gleichen Reaktionsbedingungen, ersichtlich aus dem höheren Anteil von Isomeren relativ hoher superhelikaler Dichte in Spuren c und d. Gleichzeitig wird mit längerer MET Inkubation die Endonucleaseaktivität verstärkt, erkennbar an der Zunahme der linearen DNA-Moleküle als Reaktionsprodukte.

I sc-DNA; II kovalent geschlossene, entspannte DNA; III lineare DNA; IV oc-DNA.

Präparationen deshalb nicht vorhanden, da im Zuge der Präparation des Extrakts das Chromatin quantitativ abgetrennt wurde.

3. Wechselwirkungen zwischen DNA-Topoisomerase I und besonderen DNA-Sequenzen, insbesondere der hochrepetitiven Keimbahnbegrenzten DNA von Ascaris suum

In den folgenden Abschnitten werden Wechselwirkungen zwischen DNA-adressierten Enzymen aus A. suum und der Keimbahnbegrenzten Satelliten-DNA aus A. suum beschrieben. Für die genaue Analyse erschien es zweckmäßig, diese DNA zu klonieren. Ein Bcl I-Hexamer der repetitiven Einheit wurde in der Bam H 1-Spaltstelle des Plasmids pBr 322 (Sutcliffe 1982) kloniert. Das resultierende Plasmid pAs 6 wurde über viele Generationen im E.coli-Stamm HB 101 herangezogen, wobei das Plasmidgenom stabil blieb, zumindest bezüglich der Verteilung der Erkennungssequenzen für die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsnucleasen.

3. 1. Charakterisierung des Inserts aus Keimbahnbegrenzter Satelliten-DNA im Plasmid pAs 6

Durch kombinierte Abbauten mit Bam H 1, Eco R I und Hae III wurde die Restriktionskarte des Inserts konstruiert (Abb. 9): Das Insert enthält eine singuläre Eco R I-Erkennungssequenz (Spur g) sowie vier Bam H 1-Erkennungssequenzen (Spur d). Die Position der Eco R I-Erkennungssequenz im Insert relativ zu den flankierenden Bam H 1-Erkennungssequenzen ergibt sich aus den entsprechenden Eco R I/Bam H 1-Fragmenten der Größe 65 bzw. 220 bp. Sie beide sind resistent gegen Hae III-Verdau, während das Bam H 1/Eco R I-Fragment der Größe 400 bp durch Hae III einmal gespalten wird, also von der Eco R I-Erkennungssequenz der Vektor-DNA zur ersten Bam H 1-Erkennungssequenz der Insert-DNA reicht (Abb. 9 B). Die Eco R I-Erkennungssequenz in der klonierten DNA liegt innerhalb der repetitiven Einheit an einer Stelle, an der durch eine Basensubstitution in der authentischen kb sat DNA

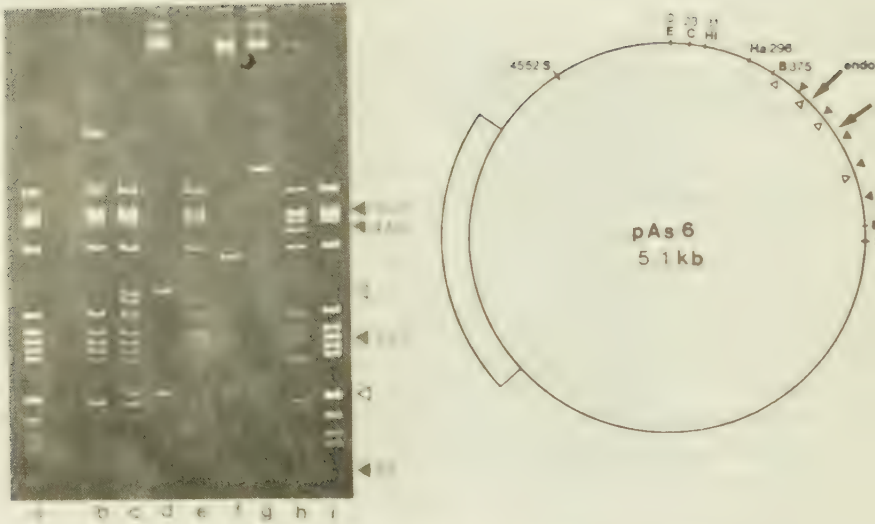


Abb. 9: Restriktionsanalyse von pAs 6

A. pAs 6 DNA wurde gespalten mit (b) Hae III, (c) Hae III gefolgt von Bam H I, (d) Bam H I, (g) Eco R I, (h) Eco R I gefolgt von Hae III, (f) Eco R I gefolgt von Bam H I, (e) Eco R I gefolgt von Bam H I und Hae III. (a, i) Hae III-Fragmente von pBr 322 DNA. Elektrophorese in 7 % Polyacrylamid. Die für die Kartierung wichtigen Bam/Hae III-Fragmente (104 bp, 270 bp, Spur c) sowie Bam H I/Eco R I-Fragmente (65 bp, 220 bp, Spur f) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Durch Eco R I wird das Hae III Fragment, welches das Insert enthält (größtes Fragment in Spur b), in zwei Fragmente der apparenten Größen 440 und 500 bp zerlegt, die durch ausgefüllte Pfeilspitzen markiert sind (Spur h). Das Eco R I/Hae III-Fragment der Größe 500 bp wird im dargestellten Gel durch das gleichlaufende Fragment der Größe 504 bp verdeckt (Doppelbande), konnte in einem anderen Experiment jedoch separat dargestellt werden. Die durch Bam H I-Restriktion pro Molekül erzeugten zwei authentischen Monomere (130 bp) und das authentische Dimer (275 bp) der kb sat DNA sind durch offene Pfeilspitzen gekennzeichnet (Spur d; zur wahren Größe der Fragmente vgl. S. 36).

B. Restriktionskarte des Plasmids pAs 6.

Die singuläre Eco R I Spaltstelle des Vektors pBr 322 (Position 0 bp) sowie die einzige im Insert gelegene Eco R I-Spaltstelle

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung der Legende zu Abb. 9

sind jeweils mit E bezeichnet. Die singuläre Cla I-Spaltstelle (Position 23 bp) ist mit C bezeichnet. Die singuläre Sca I-Spaltstelle (Position 4552 bp) ist mit S bezeichnet. Die singuläre Hind III-Spaltstelle (Position 31 bp) ist mit Hi bezeichnet. Die an das Insert grenzenden Hae III-Schnittstellen sind mit Ha bezeichnet. B bezeichnet die Nahtstellen zwischen dem Bam H I-gespaltenen Vektor (Spaltstelle an Position 375 bp) und den Bcl I-Enden des Inserts. Offene Pfeilspitzen markieren die Positionen der im Insert vorhandenen Bam H I-Spaltstellen. Mit ausgefüllten Pfeilspitzen sind die Grenzen der Bcl I-Monomere der kb sat DNA gekennzeichnet. Der Schnitt der Ascaris-Endonuclease in das Insert (vgl. S. 60) ist durch den mit "endo" versehenen Pfeil markiert. Die Region von pAs 6, die identisch mit derjenigen Region von pUC 8 ist, welche die prominenten endo-Schnittstellen enthält, ist durch Verdopplung des entsprechenden Kreisbogens markiert.

Anmerkung:

Wie im Text (S. 36) ausgeführt, zeigen alle Restriktionsfragmente, die kb sat DNA enthalten, eine verringerte elektrophoretische Mobilität. Die apparenten Längenangaben aus Abb. 9 A sind daher zur Ermittlung der tatsächlichen Abstände zwischen Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen im Insertbereich nur bedingt geeignet. Die entsprechenden Positionen in der Restriktionskarte sind daher unter Berücksichtigung der apparenten Fragmentlängen aus der Nucleotidsequenz der kb sat DNA (Streeck et al. 1982) berechnet worden. Die Zusammensetzung des Inserts aus sechs intakten Bcl I-Monomeren wird durch die im Bam H I/Hae III-Abbau auftretenden authentischen Monomere und des Dimers der repetitiven Einheit sowie die apparenten Größen der randständigen Bam H I/Hae III-Fragmente (104 bp, 270 bp) belegt. Letztere sind zusammengesetzt aus 79 bp Vektor-DNA + 25 bp kb sat DNA (Bcl I→Bam H I), bzw. aus 25 bp Vektor-DNA + 221 bp kb sat DNA (Bam H I→Bcl I + ein komplettes Bcl I-Monomer)

eine Eco R I-Erkennungssequenz entstehen kann (Streeck et al 1982). Dieser Befund zeigt, daß die Sequenz der kb sat DNA im Zuge der Klonierung nicht drastisch verändert wurde, zumindest nicht in diesem Bereich. Die Positionen der beiden äußeren Bam H I-Erkennungssequenzen des Inserts wurden durch die Bam H I/Hae III-Fragmente der Größen 104 bzw. 270 bp bestimmt (Abb. 9 A Spur c). Zur Abschätzung der Größe des Inserts wurden die Eco R I/Hae III-Fragmente der apparenten Größen 440 bzw. 500 bp (Spur h) verwendet. Durch Bam H I-Verdau werden aus dem Insert zwei Monomere - je 123 bp lang - sowie ein Dimer - 246 bp lang - der repetitiven Einheit der kb sat DNA erzeugt. Diese laufen in der Elektrophorese wie Fragmente der Größen 130 bp bzw. 275 bp (Abb. 9 A, Spur d). Derartiges Verhalten wurde bereits früher für die entsprechenden Fragmente authentischer kb sat DNA von A. suum nachgewiesen (Roth & Moritz 1981). Die Laufgeschwindigkeit dieser DNA in der Elektrophorese wird durch Sekundärstrukturen reduziert. Ähnliches Verhalten wurde für DNA der Cla I-Familie von *Chironomus* beschrieben (Schmidt 1984). Der Abstand zwischen der Bam H I-Spaltstelle an Position 400 bp und der nächstgelegenen Bcl I-Spaltstelle (derjenigen, die zur Konstruktion von pAs 6 benutzt wurde) beträgt 25 bp, wie sich aus der Längendifferenz zwischen dem Bam H I/Hae III-Fragment der Länge 104 bp (Spur c) und dem entsprechenden Bam H I/Hae III-Fragment der Vektor-DNA, das 79 bp lang ist (Sutcliffe 1982), errechnen läßt. In authentischer kb sat DNA von A. suum beträgt die Entfernung dieser Erkennungssequenzen ebenfalls 25 bp (Streeck et al. 1982).

Die Abstände zwischen den Erkennungssequenzen für Bam H I, Eco R I und Bcl I sowie deren Lage in pAs 6 zeigen, daß die Organisation der kb sat DNA im Zuge der Klonierung nicht verändert wurde (vgl. Streeck et al 1982). Zwei der sechs potentiellen Bam H I-Erkennungssequenzen sind mutiert. Die bezüglich Eco R I und Bam H I erkennbare Sequenzheterogenität der einzelnen repetitiven Einheiten bestätigt frühere eigene Befunde über Sequenzpolymorphismus der kb sat DNA sowie Beobachtungen von Müller et al. (1982). Nicht auszuschließen sind marginale Veränderungen der authentischen DNA im Zuge der Klonierung. Die Positionen der Bcl I-Erkennungssequenzen (in Abb. 9 B durch senkrechte Striche symbolisiert) können wegen

der Methylierung der Plasmid-DNA nicht direkt nachgewiesen werden, die *Taq* I-Erkennungssequenzen sind dagegen erhalten (nicht dargestellt). Durch Hybridisierung von pAs 6-DNA mit ³²P-markierter authentischer kb sat DNA wurde die Sequenzhomologie des Inserts mit authentischer kb sat DNA zusätzlich bestätigt (nicht dargestellt).

3. 2. Die DNA-Topoisomerase I bindet präferentiell an klonierte wie auch an authentische kb sat DNA von A. suum

Um die aufgewiesene DNA-Topoisomerase I aus A. suum auf spezifische Wechselwirkungen mit der kb sat DNA von A. suum zu testen, wurde topo I-Fraktion (0.5 M HAP) in einem Bindungstest untersucht: Dazu wurde pAs 6-DNA mit Hae III verdaut. Das Insert aus kb sat DNA liegt in einem Hae III-Fragment der Größe 842 bp, die anderen Hae III-Fragmente von pAs 6-DNA enthalten ausschließlich pBr 322-DNA (vgl. Abb. 9). Die Hae III-Fragmente wurden mit einem Aliquot der topo I-Fraktion im Bindungspuffer inkubiert und anschließend auf einem 7% Polyacrylamidgel ohne SDS-Denaturierung aufgetrennt. Durch die Inkubation mit der topo I-Fraktion wird die Laufgeschwindigkeit des Fragments, welches die kb sat DNA enthält, in der Elektrophorese beträchtlich herabgesetzt, während die übrigen Fragmente nicht betroffen sind (Abb. 10). Die topo I-Fraktion enthält also ein Protein, das präferentiell an kb sat DNA von A. suum bindet.

Durch Konkurrenz mit hochmolekularer Soma-DNA von A. suum läßt sich die präferentielle Bindung aufheben: Werden 50 ng pAs 6-DNA, verdaut mit Hae III, in Anwesenheit von 50 ng A. suum Soma-DNA mit der 0.5 M HAP-Fraktion inkubiert, so läßt sich die präferentielle Bindung noch nachweisen. Konkurrenz mit 500 ng Soma-DNA dagegen reicht aus, um die präferentielle Bindung an kb sat DNA total aufzuheben, das Hae III-Fragment mit dem Insert aus kb sat DNA ist wieder als nackte DNA nachweisbar (Abb. 10 A Spur d). Die präferentielle Bindung könnte demnach auf einer relativ schwachen Wechselwirkung beruhen. Andererseits könnte das Protein auch in der Soma-DNA



Abb. 10: kb sat DNA von A. suum bindet präferentiell an ein Protein der topo I-Fraktion

A. pAs 6-DNA wurde mit Hae III verdaut. 50 ng der DNA wurde (a) ohne Protein, (b, c, d) mit je 2 μ l der 10fach konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion (topo I-Fraktion) inkubiert. Als Kompetitor wurde 50 ng (c) bzw. 500 ng (d) Soma-DNA von A. suum zugefügt. Elektrophorese in 7% Polyacrylamid, Silberfärbung. Nach Inkubation mit der topo I-Fraktion ist ausschließlich das Restriktionsfragment, welches das Insert enthält (Pfeil), verzögert (b). Durch Konkurrenz mit Soma-DNA läßt es sich wieder darstellen (c, d).

B. 500 ng der Hae III-Fragmente von pAs 6 wurden mit 10 μ l der 10fach konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion (b) bzw. ohne Protein (a) inkubiert und auf 7% Polyacrylamid aufgetrennt. Das Restriktionsfragment, welches das Insert enthält (offene Pfeilspitze), wird Protein-gebunden. Die Bande stark verringerter Mobilität enthält den DNA-Protein-Komplex (Pfeil).

Bindungsstellen mit hoher Affinität erkennen (vgl. Diskussion S. 66). Der Anteil der in der Soma-DNA noch vorhandenen somasat DNA (ca. 0.3%, Ergebnis nicht dargestellt) reicht nicht aus, um den starken Kompetitionseffekt zu erklären.

Die relativ gut gereinigte Topoisomerasepräparation zeigt also präferentielle Bindung an kb sat DNA. Um zu untersuchen, ob die präferentielle Bindungskapazität tatsächlich eine Eigenschaft der Topoisomerase darstellt, wurde der Versuch unternommen, den spezifischen Komplex aus DNA und topo I auszufällen: Hochmolekulare kb sat DNA, die aus männlichen Gonaden von A. suum isoliert worden war, wurde mit der 0.5 M HAP-Fraktion für 30 min im Bindungspuffer inkubiert. Anschließend wurde PEG zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 5 %. Nach Inkubation über Nacht bei 4° C wurde der Ansatz 15 min in einer Mikrozentrifuge bei 12 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 30 µl 20 mM KP gelöst. Niederschlag und Überstand wurden auf DNA-Topoisomeraseaktivität getestet. In einem Kontrollexperiment wurde λ-DNA unter gleichen Bedingungen mit der topo I-Fraktion inkubiert und ebenfalls mit 5% PEG ausgefällt. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde die topo I-Fraktion ohne DNA im Bindungspuffer inkubiert und nach Zusatz von 5 % PEG und Inkubation über Nacht zentrifugiert. Überstand und Niederschlag wurden jeweils auf Topoisomeraseaktivität getestet. Das Ergebnis zeigt Abb. 11 A: Bei Inkubation mit 5 % PEG bleibt die Aktivität im Überstand, wenn keine DNA zugesetzt wird (Spuren a, b). Mit kb sat DNA wird die Aktivität vollständig präzipitiert (Spuren c, d). kb sat DNA wird unter den vorliegenden Bedingungen nur in Anwesenheit der topo I-Fraktion durch 5 % PEG ausgefällt. Im Kontrollexperiment ohne Zusatz der topo I-Fraktion bleibt die DNA im Überstand (Abb. 11 B). Die kb sat DNA und das Topoisomerase I-Protein bilden also einen Komplex aus, der durch 5 % PEG gefällt werden kann. λ-DNA kann die kb sat DNA in diesem Experiment nicht vertreten: die Topoisomeraseaktivität wird durch λ-DNA nicht PEG-fällbar (Abb. 11 A Spuren e, f), in Übereinstimmung damit fällt die λ-DNA nur teilweise aus (Abb. 11 A Spuren e, f). Das heißt, daß ein Komplex zwischen Topoisomerase und λ-DNA

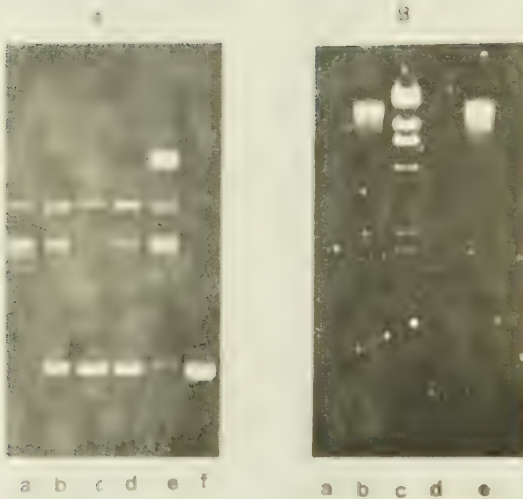


Abb. 11 Fällung von Topoisomerase-DNA-Komplexen mittels Polyäthylenglykol

A. 50 μ l der 10fach konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion (topo I-Fraktion) wurden mit hochmolekularer kb sat DNA von A. suum (c, d), mit λ -DNA (e, f) sowie ohne DNA (a, b) inkubiert. Nach Zugabe von PEG (5%) und Inkubation über Nacht wurde durch Zentrifugation ein Niederschlag gewonnen und mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung resuspendiert. Überstände (a, c, e) und Niederschläge (b, d, f) wurden durch Inkubation mit pBr 322 DNA auf Topoisomerase-Aktivität getestet. Die Topoisomerase-Aktivität wird präferentiell als Folge einer Inkubation mit kb sat DNA ausgefällt.

2. kb sat DNA von A. suum wurde unter den gleichen Bedingungen wie im Experiment unter 1 mit 50 μ l 50 % Glyzerin (in 20 mM KP) anstelle der 0.5 M HAP-Fraktion inkubiert und mit PEG (5 %) versetzt. Der Niederschlag (a, d) wurde ohne Ultraschallbehandlung resuspendiert und ebenso wie ein Aliquot des Überstandes (b, e) in 0.8 % Agarose aufgetrennt. (c) Hind III-Fragmente von λ -DNA. Die kb sat DNA wird ohne Zusatz der Proteinfraktion durch 5 % PEG nicht ausgefällt.

nicht gebildet wird oder sehr instabil ist. Zusammenfassend ergibt sich, daß ein spezifischer Komplex zwischen der DNA-Topoisomerase I und der kb sat DNA aus A. suum gebildet wird (siehe auch Diskussion S. 66).

3.3. Die Endonuclease linearisiert superhelikale DNA an wenigen ausgezeichneten Positionen

Im folgenden wurde die aufgewiesene Endonucleaseaktivität näher charakterisiert: Schon im Experiment der Abb. 8 B und 13 A zeigte sich, daß durch die Aktivität spezifisch supercoil-DNA umgesetzt wird. Lineare Moleküle werden nicht weiter verkürzt (Abb. 13 A), auch nach längerer Inkubation mit Endonuclease ist eine Verringerung des Anteils von oc-DNA zugunsten linearer Moleküle nicht zu beobachten. In zwei Kontrollexperimenten wurde diese Beobachtung bestätigt (Abb. 12): Wird Plasmid-DNA durch DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus entspannt und anschließend mit der Ascaris-Endonuclease inkubiert, so ist eine Umsetzung der DNA in oc-DNA oder lineare Moleküle nicht zu beobachten (Abb. 12). Wird oc-DNA und lineare DNA, gewonnen durch Inkubation von supercoil-DNA mit der Endonuclease aus Ascaris, erneut mit dem Enzym inkubiert, so läßt sich weder eine Umsetzung der oc-DNA in lineare DNA noch ein weitergehender Abbau der linearen Moleküle feststellen (Abb. 12, vgl. auch Abb. 13 A). Die geringfügige Zunahme der linearen DNA in Folge exzessiver Endonucleaseinkubation (Abb. 12 Spur c) dürfte durch Umwandlung der in geringem Maße in der Substrat-DNA noch vorhandenen, nicht total entspannten Topoisomere (Abb. 12 Spur d) bedingt sein. Die Aktivität setzt also exklusiv supercoil-DNA um, wobei entweder oc-DNA entsteht oder lineare Moleküle erzeugt werden.

3.3.1. Kartierung der Schnittstellen in pUC 8-DNA

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob die Ascaris-Endonuclease an definierten Positionen in supercoil-DNA

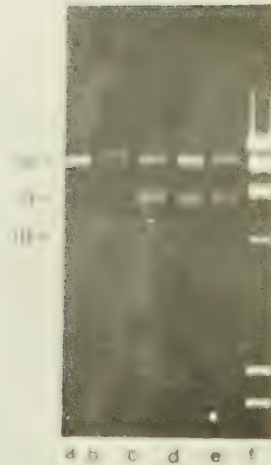


Abb. 12: Entspannte DNA und oc-DNA sind nicht Substrate für die *Ascaris*-Endonuclease
 pBr 322-DNA wurde mit 3 µl einer Präparation von *Ascaris*-Endonuclease inkubiert (a). nach Phenolextraktion wurde ein Aliquot erneut mit 3 µl der *Ascaris*-Endonuclease inkubiert (b). pBr 322-DNA wurde durch Kalbsthymus Topoisomerase entspannt. Das Protein wurde durch Phenolextraktion entfernt. Ein Aliquot dieser DNA wurde ohne Enzym (d), mit (e) 3 µl bzw. (c) 15 µl *Ascaris*-Endonuclease inkubiert. (f) Hind III-Fragmente von λ-DNA. II kovalent geschlossene, entspannte DNA; III lineare DNA; IV oc-DNA. DNA in nicht superhelikaler Form wird von der *Ascaris* Endonuclease nicht umgesetzt: Weiter wird der Anteil linearer DNA durch eine Inkubation von oc-DNA (a) mit dem Enzym erhöht (b), noch wird aus entspannter DNA (d) oc-DNA oder lineare DNA erzeugt (c, e). Die minore Fraktion linearer DNA in Spur c ist wahrscheinlich aus DNA relativ hoher superhelikaler Dichte entstanden, die in geringem Anteil in der Substrat-DNA (d) noch vorhanden war (vgl. S. 41).

schneidet: Supercoil-DNA des 2,7 kb großen Plasmids pUC 8 (Vieira & Messing 1982; Karte siehe Abb. 16) wurde mit Ascaris-Endonuclease geschnitten (Abb. 13 A). Anschließend wurde die DNA mit der Restriktionsnuclease Eco RI (Abb. 13 B Spur b) bzw. in einem weiteren Experiment mit der Restriktionsnuclease Sca I (Abb. 13 B Spur c) nachgespalten. Jedes der beiden Enzyme hat in pUC 8-DNA eine einzige Spaltstelle. Das in beiden Experimenten erzeugte Bandenmuster (Abb. 13 B Spuren b, c) zeigt, daß durch die Endonuclease eine limitierte Serie von Schnitten gesetzt wird. In jedem Experiment treten komplementäre Fragmentpaare auf. Komplementäre Fragmente sind jeweils mit gleichen Kleinbuchstaben bezeichnet, wobei das jeweils kürzere Fragment mit ' gekennzeichnet ist (Abb. 13 B und C). Der Index gibt die jeweils verwendete Restriktionsnuclease an (E = Eco RI, S = Sca I, H = Hinf I).

Aus dem sequenziellen Abbau mit endo und jeder der beiden Restriktionsnucleasen sind für jede endo-Schnittstelle jeweils zwei Positionen im circulären DNA-Molekül denkbar. Unter Benutzung der beiden prominenten Fragmentpaare d_E/d_E' und g_E/g_E' sowie d_S/d_S' und g_S/g_S' lassen sich aus dem Vergleich der mittels endo/Eco RI-Abbau (erste Positionsangabe) gewonnenen Wertepaare mit den mittels endo/Sca I-Abbau (zweite Positionsangabe) gewonnenen Wertepaare die Positionen der sieben dominierenden endo-Schnittstellen in pUC 8 eindeutig bestimmen. Für diese Schnittstellen ergeben sich folgende Positionen, bezogen auf den willkürlich gewählten Punkt O in der Karte von pUC 8 (Abb. 17): E_a 900/890; E_b 940/970; E_c 1000/1020; E_d 1170/1140; E_e 1520/1480; E_f 1580/1570; E_g 1760/1690.

Die Positionen der Schnittstellen E_a , E_b , E_c und E_d konnte durch Nachspalten eines endo/Sca I-Verdaus mit Eco RI zusätzlich bestätigt werden: In Abb. 13 C werden die Fragmente a_S , b_S , c_S und d_S durch Inkubation mit Eco RI verkürzt, während die Fragmente a_S' , b_S' , c_S' und d_S' Erkennungssequenzen für Eco RI nicht aufweisen. Die zugehörigen endo-Schnittstellen liegen also auf den angegebenen Positionen: von der Eco RI-Schnittstelle im Uhrzeigersinn

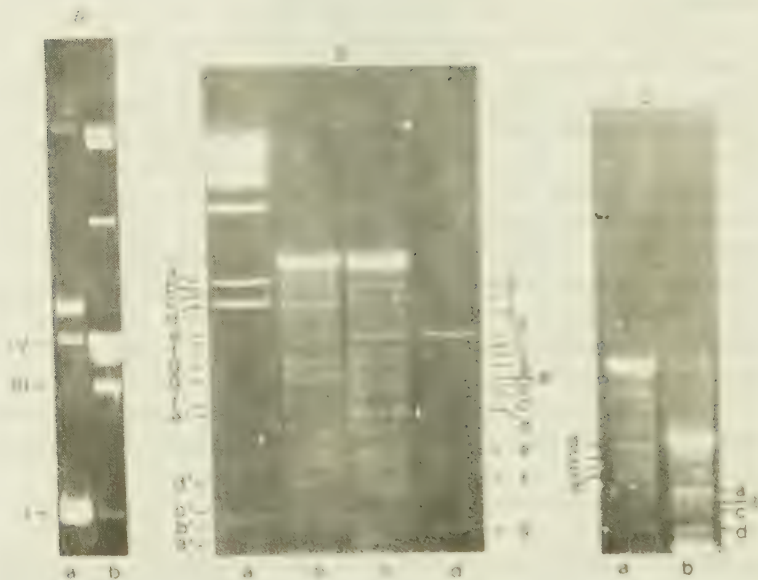


Abb. 13 Die Verteilung der Schnittstellen der *Ascaris*-Endonuclease in pUC 8 DNA und ihre Kartierung mittels Elektrophorese in 0.8 % Agarose
 A. pUC 8-DNA (2720 bp) wurde ohne Enzym (a) bzw. mit *Ascaris*-Endonuclease (b) inkubiert. Elektrophorese in 0.8 % Agarose. I supercoil-DNA; III lineare DNA; IV oc-DNA.
 B. pUC 8 DNA wurde mit *Ascaris*-Endonuclease inkubiert und mit Eco R I (b) bzw. Sca I (c) nachgespalten, die jeweils genau eine Erkennungssequenz in pUC 8-DNA haben. Sca/Eco R I Doppelverfall erzeugt die prominenten Fragmente (1740 bp, 980 bp) in C Spur b. (a) Hind III-Fragmente von λ -DNA. (d) Hinf I-Fragmente von pBR 322 DNA: 1653 bp, 817 bp. Durch Nachspalten mit der Restriktionsnuclease werden zueinander komplementäre endo/Eco R I-Fragmente (a_g, a_g' ..., in der linksseitigen Beschriftung der Abbildung verkürzt mit a, a'... bezeichnet) bzw. endo/Sca I-Fragmente (a_s, a_s' ..., in der rechtsseitigen Beschriftung der Abbildung verkürzt mit a, a'... bezeichnet) erzeugt. Für die sieben prominenten endo-Schnittstellen (E_a, E_p ..., vgl. Abb. 17) wurden die Größen der paarweise komplementären Fragmente bestimmt wie folgt (zur Zuordnung der endo/Sca I- und endo/Eco R I-Fragmente

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung der Legende zu Abb. 13:

siehe S. 43): E_a: a_E 2300, a_E' 410, a_S 1310, a_S' 1410;
E_b: b_E 2250, b_E' 470, b_S 1490, b_S' 1230; E_c: c_E
2200, c_E' 520, c_S 1540, c_S' 1180; E_d: d_E 2000, d_E'
700, d_S 1660, d_S' 1060; E_e: e_E 1670, e_E' 1050, e_S
2000, e_S' 720; E_f: f_E 1610, f_E' 1110, f_S 2100, f_S'
630; E_g: g_E 1430, g_E' 1290, g_S 2200, g_S' 510 bp. Mit
gleichen Kleinbuchstaben (a_E, a_S...) sind in beiden
Experimenten diejenigen Fragmente bezeichnet, die durch
denselben endo-Schnitt (E_a, E_b...) erzeugt wurden. Zur
Größenbestimmung wurden verwendet die vier Hind III-Fragmente
von λ -DNA der Größe 0.56 kb, 0.72 kb, 2.1 kb und 2.3 kb (a)
und die zwei Hinf I-Fragmente von pUC 8-DNA der Größe 1653 bp
und 517 bp (d). Die prominente 2.7 kb-Bande in den Spuren b und
c repräsentiert die durch endo erzeugte oc-DNA (vgl. Abb. 13 A
Spur b), die durch Eco R I bzw. Sca I linearisiert wurde. C.
pUC 8-DNA wurde mit Ascaris-Endonuclease inkubiert und mit Sca
I nachgespalten(a). Ein Aliquot wurde anschließend zusätzlich
mit Eco RI nachgespalten (b). Die Fragmente d_S, c_S, b_S
und a_S werden durch Eco R I verkürzt, die Fragmente a_S',
b_S', c_S' und d_S' dagegen nicht. In der Abbildung ist die
verkürzte Schreibweise angewendet (a_S = a etc.).

liegt jeweils das kürzere der komplementären endo/Eco R I-Fragmente (Abb. 17). Die übrigen endo/Sca I-Fragmente können durch Eco R I-Verdau nicht erneut identifiziert werden, da die Fragmente g_S , f_S , e_S unabhängig von der Lage der zugehörigen endo-Schnittstelle immer eine Eco R I-Schnittstelle aufweisen, während g_S' , f_S' und e_S' unabhängig von der Lage der endo-Schnittstelle resistent gegen Eco R I-Nachspaltung sind .

Um die Position der Schnittstellen durch Analyse mittels hochauflösender Polyacrylamidgele genauer zu kartieren, wurde endo-verdaute pUC 8-DNA mit Eco R I gespalten und die Spaltstellen durch ^{32}P -dATP am 3'-Ende mittels Klenow-Polymerase markiert. In einem weiteren Experiment wurde endo-verdaute pUC 8-DNA mit Hind III gespalten (pUC 8 enthält genau eine Hind III-Erkennungssequenz). Nach Abtrennen der gesamten oc-DNA und der endo/Hind III-Fragmente einer Größe von mehr als 2 kb mittels eines präparativen Sucrosegradienten (nicht dargestellt) wurden die Hind III-Spaltstellen der verbliebenen endo/Hind III-Fragmente durch ^{32}P -dATP am 3'-Ende mittels Klenow Polymerase markiert. Sowohl die endo/Eco R I-Fragmente als auch die endo/Hind III-Fragmente wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei diesem Experiment ist eine Reihe von Banden darstellbar, die endo/Hind III- bzw. endo/Eco RI-Fragmente repräsentieren (Abb. 14). Aufgrund der vergleichsweise hohen Gesamt Radioaktivität in Spur b der Abb. 14 sind die Banden der endo/Eco R I-Fragmente nur als Ausbuchtungen der Spur nachweisbar, bei kürzerer Autoradiographiedauer treten an diesen Positionen diskrete Banden auf.

Die Position der jeweiligen endo-Schnittstelle wurde durch Nachspalten der endo/Eco RI-Fragmente mit Hind III sowie durch Nachspalten der endo/Hind III-Fragmente durch Eco R I bestätigt: Die Hind III-Markierung (d. h. die 3'-Markierung an dem durch Hind III-Spaltung erzeugten Fragmentende) der prominenten endo/Hind III Fragmente (Spur d) wird durch die Eco RI-Nachspaltung entfernt (Spur c), die Banden verschwinden (Abb. 14). Daraus folgt erstens, daß alle derartigen Fragmente eine Eco RI-Schnittstelle enthalten, womit die Position der



Abb. 14 Kartierung der Endonuclease-Schnittstellen in pUC 8 mittels Elektrophorese in 10 % Polyacrylamid
 endo-geschnittene pUC 8-DNA wurde mit Eco R I gespalten. Die Eco R I-Schnittstelle wurde mittels Klenow-Polymerase 3'-endmarkiert (b). Ein Aliquot der DNA wurde mit Hind III nachgespalten (a). endo-geschnittene pUC 8-DNA wurde mit Hind III gespalten. Die endo/Hind III-Fragmente wurden mittels eines Sucrosegradienten größenfraktioniert. Die Fraktionen mit Fragmenten <2 kb wurden vereinigt. Die Hind III-Spaltstelle dieser Fragmente wurde mittels Klenow-Polymerase 3'-endmarkiert (d). Ein Aliquot der markierten DNA wurde mit Eco R I nachgespalten (c). Denaturierendes Polyacrylamidgel 10 %. Die Positionen der Hinf I-Fragmente A, B und C von pUC 8-DNA sind durch Striche markiert (Spur e). Die Größe derselben ist in bp angegeben. Mit Hilfe dieses Längenstandards wurden für die endo/Eco RI-Fragmente folgende Größen berechnet: i_E' : 290; h_E' : 320-350; a_E' : 415; b_E' : 500; c_E' : 550; c_E'' : 580; d_E' : 680; d_E'' : 750 bp (Spur a, verkürzte Schreibweise gilt entsprechend Abb. 13). Während durch Eco RI die Markierung einiger endo/Hind III-Fragmente abgespalten wird (Spur d versus Spur c, siehe S. 46), werden die in der Abbildung bezeichneten endo/Eco RI-Fragmente durch Hind III nicht verkürzt (Spur b versus Spur a, vgl. S. 48)

entsprechenden endo-Schnittstellen (Angabe in bp) eindeutig festgelegt ist: E_a 900, E_b 970, E_c 1020, E_d 1150. Zweitens folgt aus diesem Experiment, daß die authentischen durch endo erzeugten Fragmentenden durch die Kombination von ^{32}P -dATP und Klenow-Polymerase nicht signifikant markierbar sind. Anderenfalls hätten in Spur c um 31 bp (dies ist der Abstand zwischen der Eco R I- und der Hind III-Spaltstelle in pUC 8-DNA) verkürzte, autoradiographisch darstellbare, Banden auftreten müssen.

Die endo/Eco R I-Fragmente (Abb. 14 Spur b) werden durch Inkubation mit Hind III nicht verändert (Spur a), enthalten also keine Hind III-Spaltstelle. Damit werden die Positionen der endo-Schnittstellen erneut bestätigt. Eine weitere Absicherung des Resultats ergibt sich aus dem direkten Vergleich der endo/Hind III-Fragmente mit den endo/Eco R I-Fragmenten. Zu jedem endo/Hind III-Fragment gibt es ein entsprechendes endo/Eco R I-Fragment, das um 31 bp kürzer ist, entsprechend der Distanz zwischen der Eco R I- und der Hind III-Spaltstelle in pUC 8-DNA. Die zugehörigen endo-Schnittstellen liegen also alle an den Positionen, die bereits mit Hilfe der Agarosegele (Abb. 13 B, C) ermittelt wurden.

Die Markierung einiger niedermolekularer endo/Hind-Banden (kleinste Banden in Abb. 14 Spur d) wird durch Eco R I nicht abgespalten. Diese sollten also von (bisher nicht beschriebenen) Schnittstellen herrühren, die auf der anderen Seite (entgegen dem Uhrzeigersinn in Abb. 17) der Eco R I-Schnittstelle liegen (etwa Position 200 bp). Dies müßte aber durch weitere Experimente abgesichert werden.

Verglichen mit den aus den Agarosegelen ermittelten Positionsangaben getattet das besser auflösende Polyacrylamidgel detailliertere Positionsangaben: Hinter dem durch die Auswertung der Agarosegele definierten Fragment d_E' verbergen sich ein prominentes Fragment d_E'' der Größe 680 bp und ein schwächeres Fragment d_E''' der Größe 750 bp. Fragment c_E' wird in zwei Fragmente c_E' und c_E'' der Größen 550 und 580 bp aufgetrennt. Zusätzlich sind vier weitere Fragmente der Größen 320-350 (Schnittstellen E_h) und 290 bp

(Schnittstelle E_1) nachweisbar. Diese hier erstmals aufgewiesenen endo/Eco R I-Fragmente konnten in den Agarosegelen (Abb. 13 B) nicht als isolierte Banden dargestellt werden.

Im Unterschied zu den Intensitätsunterschieden einzelner Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid (Abb. 13) ist die relative Intensität einer Bande im Autoradiogramm (Abb. 14) nicht repräsentativ für die Prominenz der zugehörigen endo-Schnittstelle. Wenngleich aufgrund der Endmarkierung unter der Voraussetzung äquimolarer Anteile der einzelnen Fragmente alle Banden gleich intensiv markiert sein sollten, beobachtet man stets eine Abnahme der Intensität der Banden mit steigender Fragmentgröße (vgl. Abb. 15 A Spur e). Dies beruht darauf, daß im denaturierenden Gel DNA-Moleküle mit zunehmender Länge in zunehmendem Ausmaß fragmentiert werden und nicht mehr als Bande darstellbar sind.

Die in Abb. 14 dargestellten Banden bleiben in ihrer Intensität und relativen Anordnung unverändert, unabhängig davon, ob die gesamte endo-inkubierte DNA markiert und aufgetragen wird (Spuren a, b) oder ob vor der Markierung die oc-DNA mittels Sucrosegradienten quantitativ abgetrennt wird (Spuren c, d). Daraus folgt, daß die im denaturierenden Gel sichtbaren Banden Spaltprodukte der endo-linearisierten DNA darstellen und nicht etwa die Einzelstrangbrüche repräsentieren, die durch die Endonuclease in supercoil-DNA eingeführt werden und zum Auftreten der oc-DNA führen (etwa 70 % der DNA, vgl. Abb. 13 A Spur b). Diese Schlußfolgerung wird durch folgendes Kontrollexperiment unterstützt: Dieselbe DNA wurde auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt (nicht dargestellt). Die Banden treten wieder auf, wenn auch die Laufeigenschaften des nativen Gels insgesamt sehr viel schlechter sind, verglichen mit denjenigen des denaturierenden Gels.

Die durch Inkubation mit der Ascaris-Endonuclease erzeugte oc-DNA wie auch die endo-linearisierte DNA sind zu einem gewissen Ausmaß mittels Klenow-Polymerase ^{32}P -markierbar; jedoch wird in diese Formen wesentlich weniger Radioaktivität inkorporiert als in dieselbe DNA nach Restriktionsverdau (nicht

dargestellt). Die in Abb. 14 dargestellte inkorporierte Radioaktivität befindet sich demnach zum größten Teil in der DNA, die durch die Ascaris-Endonuclease linearisiert wurde.

Mit Hilfe der bisher durchgeführten Experimente läßt sich lediglich die Lage der endo-Schnittstellen bestimmen. In einem weiteren Experiment wurde die Frage nach der Struktur der durch die Endonuclease erzeugten Enden untersucht: endo-geschnittene pUC 8-DNA wurde mit Hinf I nachgespalten. Durch Hinf I-Verdau wird pUC 8-DNA in fünf Fragmente der Größen 1631, 517, 396, 75 und 65 bp gespalten. Die Hinf I-Spaltstellen an den Positionen 662, 727, 802, 1197 bzw. 1715 bp liegen in der Nachbarschaft der prominenten endo-Schnittstellen (Abb. 17), so daß mittels Hinf I- Restriktion endo-linearisierter DNA eine Feinanalyse der endo-Schnittstellen möglich ist.

Die resultierenden endo/Hinf I-Fragmente wurden an der Hinf I-Schnittstelle durch ^{32}P - α -dATP mittels Klenow-Polymerase 3'-endmarkiert (Abb. 15 Spuren a, f). Parallel dazu wurden die gleichen Fragmente durch ^{32}P - γ -ATP mittels Polynucleotidkinase markiert. Während durch die Klenow-Polymerase das 3'-Ende der Hinf I-Spaltstelle markiert wird, wird durch Polynucleotidkinase das 5'-Ende markiert, also der komplementäre Strang. Durch Koelektrophorese im denaturierenden Gel (Abb. 15 Spuren a, d) ist der direkte Vergleich der komplementären Stränge der einzelnen endo/Hinf I-Fragmente möglich. Es zeigt sich, daß zu jedem Klenow markierten Einzelstrang ein PNK-markierter Strang nahezu identischer Laufeigenschaften auftritt. Unter Berücksichtigung des Auflösungsvermögens des Polyacrylamidgels sind also beide Stränge etwa gleich lang. Falls überhaupt überhängende Einzelstränge als Produkt eines endo-Abbaus erzeugt werden, sind diese also relativ kurz. Das Auftreten der authentischen Hinf I Fragmente von pUC 8 in Abb. 15 Spur d zeigt, daß die Hinf I-Enden in diesem Experiment von der Polynucleotidkinase effizient markiert wurden. Die zusätzlich auftretenden Banden in dieser Spur repräsentieren demnach endo/Hinf I-Fragmente, die am 5'-Ende der Hinf I-Spaltstelle markiert sind.

Für den 3'-markierten Einzelstrang des Fragments f_H findet sich in der Schar der 5'-markierten Einzelstränge kein

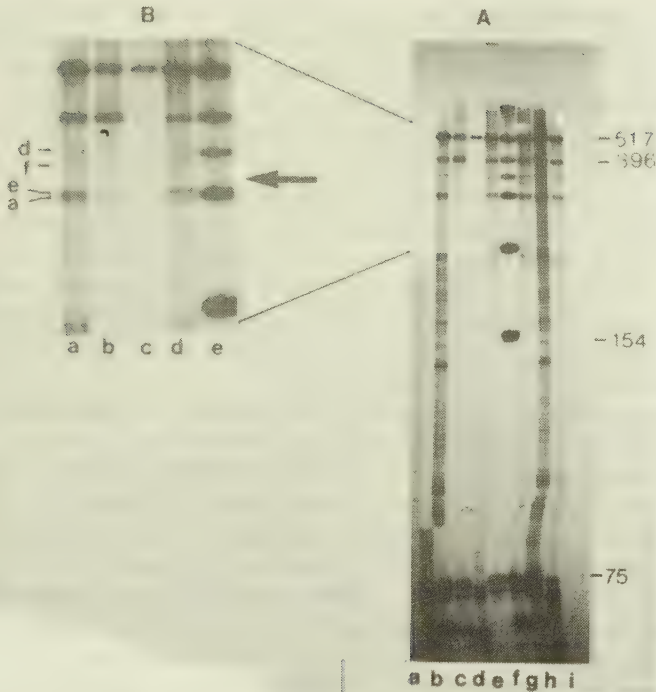


Abb. 15: Durch einen Endonucleaseschnitt werden überhängende Einzelstränge nicht erzeugt

A. Koelektrophorese der komplementären Einzelstränge (Spuren a bis f). endo/Hinf I-Fragmente wurden durch Klenow-Polymerase 3'-endmarkiert (a, f). endo/Hinf I-Fragmente wurden durch ^{32}P - γ -ATP mittels PNK 5'-endmarkiert (d). Die komplementären Stränge der endo/Hinf I-Fragmente zeigen nahezu identisches Laufverhalten. Dies gilt nicht für das Fragment f_H (Vgl. Abb. 16 B). S_1 -Nuclease-Abbau der 3'-markierten endo/Hinf I-Fragmente (Spuren g bis i). 3'-markierte endo/Hinf I-Fragmente wurden mit 0 U (g), 2 U (h) bzw. 20 U (i) Nuclease S_1 inkubiert. (b) Hinf I-Fragmente von pUC 8-DNA. (e) Hinf I-Fragmente von pBr 322-DNA: 75 bp, 154 bp, 220/221 bp, 298 bp, 348 bp, 396 bp, 506/517 bp, 1651 bp. Denaturierendes Polyacrylamidgel 10 %. Die 3'-markierten Einzelstränge der endo/Hinf I-Fragmente werden durch S_1 -Nuclease nicht verkürzt. B. Der Größenbereich zwischen 220 bp und 550 bp der Abbildung 15 A ist vergrößert dargestellt. Der Pfeil markiert den 5'-endmarkierten Einzelstrang, der dem Fragment f_H (verkürzt mit f bezeichnet) zugeordnet wird (vgl. S. 52)

Fragment gleicher Mobilität. Stattdessen tritt in Spur d eine zusätzliche Bande auf, die ein 5'-markiertes Fragment größerer Mobilität, bezogen auf den 3' markierten Strang des Fragments f_H , repräsentiert. (Abb. 15, Spur d, zur Bezeichnung des Fragments vgl. Abb. 16 B). Das unterschiedliche Laufverhalten der komplementären Stränge könnte durch einen relativ großen Längenunterschied bedingt sein. Alternativ dazu könnten die unterschiedlichen Laufeigenschaften durch Sequenzunterschiede zwischen den komplementären Strängen (Basenzusammensetzung, Sekundärstrukturen) bedingt sein. Mittels eines hochauflösenden Sequenzmarkers des entsprechenden Fragments könnte diese Frage geklärt werden.

Zur Absicherung des Befundes, daß die von der Ascaris-Endonuclease erzeugten Enden weder durch überhängende Einzelstränge noch durch terminal exponierte Auffaltungen charakterisiert sind, wurden 3'-endmarkierte endo/Hinf I-Fragmente mit der einzelstrangspezifischen Nuclease S_1 (Ando 1966) in zwei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. In diesem Experiment werden die 3'-endmarkierten endo/Hinf I-Fragmente durch S_1 -Nuclease nicht verkürzt (Abb. 15 Spur h). Die Tatsache, daß durch Inkubation mit 20 U Nuclease S_1 die 3' Markierung am Hinf I-Ende aller Fragmente abgeschnitten wird (Spur i), zeigt, daß in diesem Experiment, bezogen auf die eingesetzte DNA Menge (ca. 1-5 ng), die S_1 Nuclease im hohen Überschuß vorhanden war (Bei Inkubation mit großem Enzymüberschuß wird durch S_1 auch gepaarte Doppelstrang DNA geschnitten). Die Bedingungen für eine effektive Verdauung von Einzelsträngen sind deshalb auch bei Zugabe von 2 U S_1 Nuclease (Spur h) erfüllt. Durch dieses Experiment wird bestätigt, daß zumindest der 3'-markierte Strang an keinem der endo-Enden weit überhängt. Die 5'-markierten Einzelstränge können durch Verdau mit S_1 Nuclease nicht charakterisiert werden, da durch das Enzym die 5'-Endmarkierung, die sich am Ende des 5'-Einzelstrangüberhangs befindet, entfernt würde.

Zur eindeutigen Identifizierung der endo/Hinf I-Fragmente wurden diese durch mehrere Restriktionsendonucleasen nachgespalten. Letztere wurden so ausgewählt, daß Schnittstellen in der Nähe der Hinf I-Schnittstellen erkannt

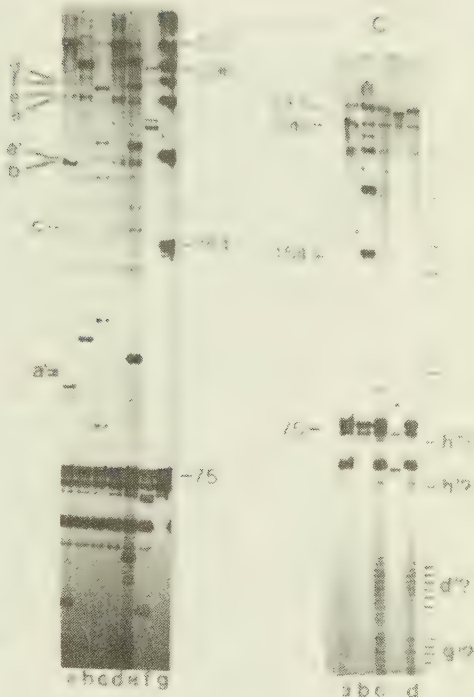
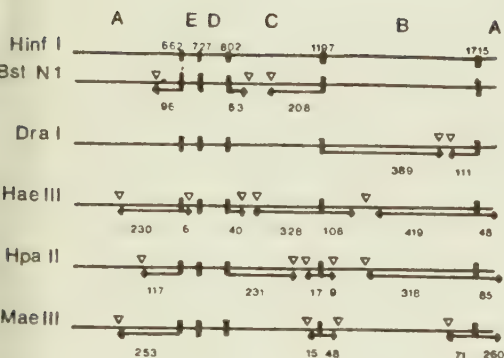


Abb. 16: Feinkartierung der Endonuclease-Schnittstellen in pUC 8-DNA

A. Lage der Spaltstellen für Bst N I, Dra I, Hae III, Hpa II und Mae III relativ zu den Hinf I-Spaltstellen in pUC 8. Die vier kleinsten Hinf I-Fragmente von pUC 8 (B, C, D und E) sind mit den Schnittstellenpositionen (angegeben in bp, vgl. Abb. 17) dargestellt. Für jedes der dargestellten Restriktionsenzyme ist angegeben, um welchen Betrag es das jeweilige Hinf I-Fragment verkürzt. Für alle Enzyme sind nur diejenigen ihrer Schnittstellen aufgeführt, die im jeweiligen Hinf I-Fragment den Enden am nächsten liegen.

B. endo/Hinf I-Fragmente von pUC 8-DNA (d) wurden gespalten mit (a) Bst N I, (b) Dra I, (c) Hpa II, (e) Hae III sowie (f) Mae III. (g) Hinf I-Fragmente von pBr 322-DNA. Durch Nachspalten mit den Restriktionsnucleasen wurde für jedes der bezeichneten endo/Hinf I-Fragmente die Position der zugehörigen endo-Schnittstelle bestimmt. Die bezeichneten Fragmente wurden durch Analyse ihres Verhaltens gegenüber den Restriktionsnucleasen identifiziert. Die Länge der Fragmente (wie in Abb. 14 wird in der Abbildung die verkürzte Schreibweise verwendet: a_H = a etc.) wurde aus ihrem

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung der Legende zu Abb. 17

Laufverhalten bestimmt wie folgt: $d_H = 355$, $a_H = 295$, $a'_H = 100-102$, $b_H = 214$, $c_H = 165$, $f_H = 335$, $e_H = 300$, $e'_H = 215$ bp.

C. endo geschnittene pUC 8 DNA wurde mit Hinf I gespalten. Die Hinf I-Spaltstelle wurde durch Klenow-Polymerase markiert (c, d). (a) Hinf I-Fragmente von pUC 8 DNA. (b) Hinf I-Fragmente von pBr 322-DNA. Denaturierendes Polyacrylamidgel 12 %. Zur Identifizierung der Fragmente d_H' , g_H' und h_H' (in der Abbildung mit d', g', h' bezeichnet) siehe S. 57

wurden (vgl. Abb. 16 A). Wie die Auswertung der Agarosegele ergab, liegen alle prominenten Schnittstellen in den Hinf I-Fragmenten B (517 bp), C (396 bp), D (75 bp) und E (65 bp) von pUC 8. Die Spaltbarkeit eines beliebigen endo/Hinf I-Fragments durch eine weitere Restriktionsnuclease läßt Rückschlüsse auf die Herkunft des Fragments zu. Wenn z. B. ein endo/Hinf I-Fragment mit einem Molekulargewicht zwischen 111 und 389 bp, das an der Hinf I-Spaltstelle radioaktiv markiert ist, durch Dra I verkürzt wird, folgt daraus, daß dieses Fragment durch Hinf I-Spaltung an Position 1715 bp entstanden ist, und die endo-Schnittstelle im Hinf I-Fragment B liegt (vgl. Abb. 16 A). In Zweifelsfällen entscheidet der Vergleich der Resultate mit verschiedenen Restriktionsnucleasen.

Die Analyse ist für die Fragmente a_H und a_H' exemplarisch dargestellt: a_H hat die Länge 295 bp, wird gespalten durch die Enzyme Bst N 1, Hpa II und Mae III; nicht gespalten wird a_H durch die Enzyme Dra I und Hae III. Damit ist eindeutig festgelegt, daß der 3'-markierte Einzelstrang des Fragments a_H sich von Position 1197 bp (Hinf I-Markierung) zur Position 902 bp (Endonucleaseschnitt) erstreckt. a_H' wird repräsentiert durch zwei Banden der Länge 102 bzw. 103 bp, wird geschnitten durch Bst N 1 und Hae III, nicht geschnitten wird a_H' durch die Restriktionsnucleasen Dra I, Hpa II und Mae III. Der 3'-markierte Einzelstrang des Fragments a_H' erstreckt sich also von Position 802 bp (Hinf I-Markierung) zu Position 903-904 bp (Endonucleaseschnitt).

Mit diesem Verfahren konnten die Fragmente a_H , a_H' , b_H , c_H , d_H , e_H , e_H' und f_H (mit ' ist jeweils das kleinere der komplementären endo/Hinf I-Fragmente gekennzeichnet) eindeutig identifiziert werden (Abb. 16 B). Die Positionen (in bp) der entsprechenden Schnittstellen sind damit wie folgt bestimmt: E_a 902/903-904; E_b 983; E_c 1032; E_d 1157; E_e 1497/1500; E_f 1532 (Abb. 17).

Aus den Positionsangaben lassen sich die Erwartungswerte für die Größe der noch fehlenden komplementären 3'-markierten endo/Hinf I-Fragmente ableiten. In der Tat finden sich im erwarteten Größenbereich im Gel (Abb. 16 C sowie 16 B) jeweils eine oder mehrere Banden, die aber mit den hier dargestellten

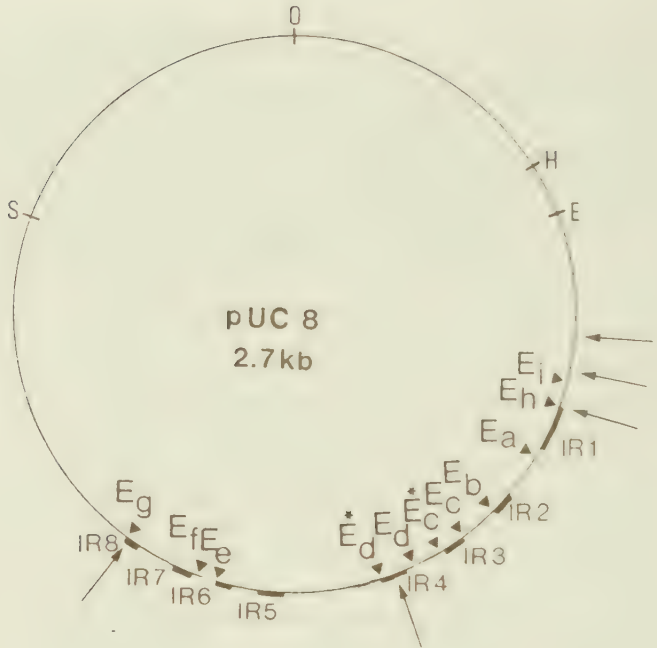


Abb. 17: Positionen der Endonuclease-Schnittstellen im Genom von pUC 8

O bezeichnet den willkürlich gewählten Bezugspunkt für die Positionsangaben. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco R I (472 bp), Hind III (441 bp) sowie Sca I (2200 bp) sind durch E, H, bzw. S bezeichnet, die Hinf I-Schnittstellen sind durch Pfeile bezeichnet (Vieira & Messing 1982). Die Positionen der identifizierten Schnittstellen für die *Ascaris* Endonuclease (mit Pfeilspitzen markiert) liegen an folgenden Positionen:

E₁: 760, E_h: 790-820, E_a: 902/902-904, E_b: 983, E_c: 1032, E_c*: 1060, E_d: 1157, E_d*: 1227, E_e: 1497/1500, E_f: 1532, E_g: ca. 1700. Die aus der Sequenz ermittelten interrupted inverted repeats (IIR) sind dargestellt

(verstärkter Strich), sie liegen an folgenden Positionen: IIR 1: 836-888 bp, IIR 2: 946-987 bp, IIR 3: 1027-1068 bp, IIR 4: 1173-1215 bp, IIR 5: 1405-1429 bp, IIR 6: 1455-1499, IIR 7: 1534-1584 bp, IIR 8: 1662-1717 bp (vgl. S. 58 und S. 70).

Experimenten nicht eindeutig definiert werden konnten. Mit Fragezeichen versehen sind in der Abb. 16 C und 16 B die mutmaßlichen Positionen der Fragmente d_H' (ca. 40 bp) sowie h_H (71 bp) und h_H^* (60 bp) angegeben. Die Schar der niedermolekularen prominenten Fragmente im Größenbereich um 20 bp könnte die Gruppe der Fragmente g_H' repräsentieren. In diesem Fall könnte man davon ausgehen, daß, obwohl E_g eine der prominentesten endo-Schnittstellen ist (Abb. 13 B), das Fragment g_H deshalb nicht entdeckt wird, weil es in der Elektrophorese genauso läuft wie das authentische Hinf I-Fragment der Größe 517 bp. Alternativ dazu könnte die Schnittstelle E_g im größten Hinf I-Fragment von pUC 8-DNA (A, 1631 bp) liegen. Das größere der resultierenden endo/Hinf I-Fragmente hätte dann ca. 1, 6 kb und würde in den dargestellten Gelen aufgrund seiner Größe der Beobachtung entgehen, ebenso wie das authentische Fragment A (1631 bp) (vgl. Abb. 16 C).

3. 3. 2. Zuordnung von Endonucleaseschnittstellen und Sekundärstrukturen in pUC 8-DNA

Im folgenden wurde versucht, die Kriterien für die Ausbildung einer Schnittstelle durch vergleichende Analyse der entsprechenden DNA-Abschnitte zu ermitteln. Dabei wurden die Teilprogramme des Programmpakets "UWCGG Sequence Analysis" (Devereux et al. 1984) verwendet. Der direkte Sequenzvergleich der DNA-Bereiche in der Nähe der einzelnen Schnittstellen (± 10 bp) mit dem Teilprogramm "BESTFIT" ergab, daß signifikante Sequenzhomologien zwischen den Schnittstellen nicht vorliegen (nicht dargestellt). Um die Schnittstellen in pUC 8 mit bestimmten Sekundärstrukturen zu korrelieren, wurde die pUC 8-Sequenz auf gemeinsame Eigenschaften der ermittelten Schnittstellen untersucht. Lokale Schwankungen des A/T-Gehalts, dargestellt durch die Teilprogramme "WINDOW" und "COMPOSITION" sind in keiner Weise mit den aufgewiesenen Schnittstellenpositionen korreliert (nicht dargestellt).

In einem weiteren Schritt wurden mittels des Teilprogramms

"STEMLOOP", das auf dem von Zuker et al. (1981) entwickelten Algorithmus beruht, aus der Sequenz von pUC 8 die Abschnitte mit unterbrochener Spiegelbildsymmetrie ("interrupted inverted repeats", im folgenden als IIR-Elemente bezeichnet) ermittelt, wobei als Kriterium für die Qualität der resultierenden Rückfaltungsschleife ("stem-loop") die Summe der Wasserstoffbrückenbindungen im "stem" ($A/T = 2$, $G/C = 3$) verwendet wurde. Die Länge des "loop" wurde auf maximal 30 Basen begrenzt. Die ermittelten IIR-Elemente wurden nach Qualität geordnet, ihre Positionen wurden mit den Positionen der aufgewiesenen Schnittstellen verglichen. Dabei zeigte sich eine bemerkenswerte Korrelation: Die beiden besten IIR Elemente befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft je einer prominenten Endonuclease-Schnittstelle. In unmittelbarer Nachbarschaft jeder weiteren Schnittstelle befindet sich ebenfalls ein gutes IIR-Element (Tab. 1; vgl. Abb. 17).

Andererseits gibt es jedoch IIR-Elemente, an denen nicht geschnitten wird (z. B. IIR 5). Durch Einengung des Kriteriums der zugelassenen "loop"-Größe konnte die Korrelation weiter verbessert werden, so daß jeder Schnittstelle genau eine "stem-loop"-Struktur guter Qualität zugeordnet werden kann (Abb. 17, vgl. Diskussion). In den Fällen, in denen eine genaue Bestimmung möglich war (E_a , E_b , E_d , E_e , E_f), konnte gezeigt werden, daß der 3'-markierte Einzelstrang etwa 0-20 Nucleotide vor der ersten potentiell rückgefalteten Base geschnitten wurde. Die Schnittstelle E_c liegt nach den dargestellten Ergebnissen fünf Nucleotide innerhalb des Rückfaltungsstammes (vgl. Legende zu Abb. 17). Ob dieser Befund tatsächlich eine Ausnahme darstellt, kann nur mittels eines Sequenzmarkers, der die Auflösung auf ein Nucleotid genau möglich macht, geprüft werden.

3. 3. 3. Kartierung der Schnittstellen für die Ascaris-Endonuclease in kb sat DNA aus A. suum

Um spezifische Wechselwirkungen der aufgewiesenen Endonucleaseaktivität mit der Ascaris kb sat DNA zu

Tabelle 1 : Verteilung der IIR-Elemente in pUC 8-DNA,
Korrelation mit den aufgewiesenen Endonuclease-Schnittstellen

IIR	Position	Qualität	Größe des "loop"	Schnitt
8	1662-1717	29	28	ja (g)
1	836-888	29	27	ja (a, h)
5	1405-1429 ⁺	28	3	nein
9	500-534	28	9	nein
7	1534-1584	26	25	ja (f)
10	42-91	26	30!	nein!
3	1027-1068	24	24	ja (c, c*)
11	1560-1585 ⁺	23	6	nein
12	1399-1439	21	23!	nein!
2	946-987	21	26	ja (b)
13	1464-1486 ⁺	21	5	nein
6	1455-1499	19	27	ja (e)
4	1173-1215	15	27	ja (d, d*)

Aus der pUC 8-Sequenz wurden die potentiellen "stem-loops" ermittelt, wobei die Größe des "loop" auf maximal 30 Nucleotide begrenzt wurde. Jedes IIR-Element ist charakterisiert durch seine Qualität (= Summe der Wasserstoffbrückenbindungen im "stem") sowie die Länge des jeweiligen "loop". Die ermittelten IIR-Elemente sind in der Tabelle nach Qualität geordnet. Es sind diejenigen IIR-Elemente dargestellt, die Schnittstellen für die *Ascaris*-Endonuclease benachbart liegen. Weiterhin sind ausgewählte IIR-Elemente dargestellt, die nicht mit einer Schnittstelle korreliert sind. Die besten sechs IIR-Elemente sind in ununterbrochener Reihe dargestellt. IIR-Elemente mit einer "loop"-Größe von weniger als 23 Nucleotiden sind im unteren Teil der Tabelle nicht dargestellt, auch wenn ihre Qualität den Wert des schlechtesten mit einer Schnittstelle korrelierten IIR (IIR 4, Qualität 15) übertrifft (im betrachteten Qualitätsintervall gibt es etwa 30 derartige IIR-Elemente). Mit ⁺ sind die Elemente gekennzeichnet, die Schnittstellen für die T₄-Endonuclease VII ausbilden (Lilley & Kemper 1984). Mit "!" sind diejenigen IIR-Elemente gekennzeichnet, die zur Abgrenzung der zugelassenen "loop"-Größe verwendet wurden.

untersuchen, wurde supercoil-DNA des Plasmids pAs 6 (vgl. Kap. III. 3. 1.) mit der Endonuclease geschnitten. Die endo-geschnittene DNA wurde durch Hind III nachgespalten. Das resultierende Bandenmuster läßt, ähnlich wie dasjenige von pUC 8, auf eine begrenzte Anzahl von Schnittstellen im Molekül schließen (Abb. 18 A). Da das pAs 6-Genom aber fast doppelt so groß wie dasjenige von pUC 8 ist, gestaltet sich die Analyse mittels Agarosegel sehr schwierig und unbefriedigend.

Da eventuelle Schnitte im Insert für die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung besonders interessant sind, wurde auf die komplette Analyse aller Schnittstellen verzichtet. Stattdessen wurde gezielt nach Schnittstellen im Insert gesucht. Nach endo/Hind III-Abbau von pAs 6-DNA tritt ein Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 4.4 kb auf (Abb. 18 A Spur b). Der zugehörige Schnitt könnte im Insert liegen, alternativ dazu könnte sich die Schnittstelle etwa an Position 4400 bp im Genom von pAs 6 befinden (vgl. Abb. 9). Zur Klärung der Frage wurde die DNA nach endo/Hind III Verdau mit Eco RI bzw. Sca I nachgespalten:

Wenn die Endonuclease-Schnittstelle im kb sat DNA-Insert von pAs 6 liegt, so sollte das endo/Hind III-Fragment der Größe 4.4 kb durch Abbau mit Sca I um 548 bp (Abstand zwischen der Hind III- und der Sca I-Spaltstelle in pAs 6) verkürzt werden. Durch Verdau mit Eco R I sollte das endo/Hind III-Fragment der Größe 4.4 kb dagegen um maximal ca. 350 bp (Abstand zwischen der im Insert gelegenen Eco R I-Spaltstelle und der Grenze des Inserts an Position 375 bp in pAs 6, vgl. Abb. 9 B) verkürzt werden, falls die Schnittstelle für die Endonuclease aus *Ascaris* in der Insertregion von pAs 6 liegt. Wie das Experiment zeigt (Abb. 18 A), läßt sich das endo/Hind III- Fragment der Größe 4.4 kb mit Sca I auf ca. 3.9 kb (Spur c) verkürzen. Durch Inkubation mit Eco RI dagegen wird dieses Fragment dagegen auf ca. 4.2 kb, also nur unwesentlich, verkürzt (Spur a). Die endo-Schnittstelle liegt demnach innerhalb der kb sat DNA von pAs 6.

In einem weiteren Experiment wurde pAs 6-DNA nach Abbau mit der *Ascaris* Endonuclease mit der Restriktionsendonuclease Cla I gespalten. Dieses Enzym spaltet die pAs 6-DNA an nur einer

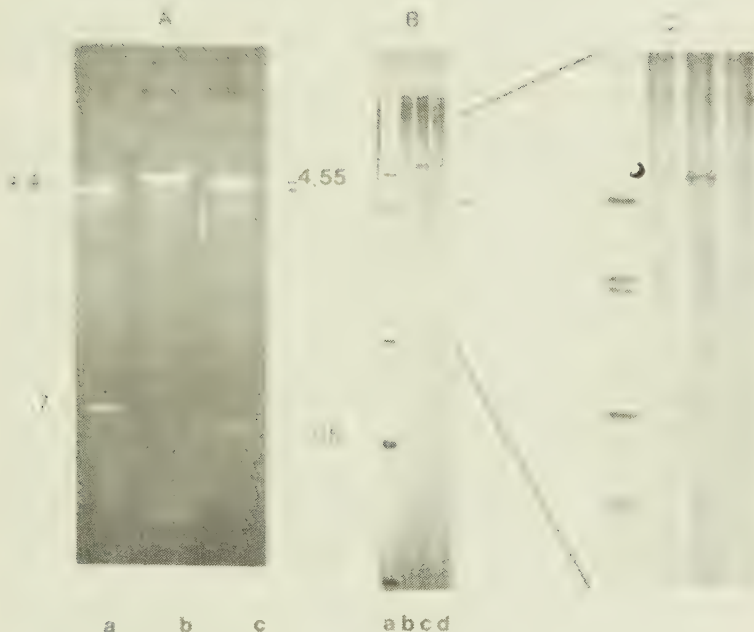


Abb. 18: Kartierung von Endonuclease-Schnittstellen in der kb sat' DNA von A. suum
A. pAs 6-DNA wurde durch Ascaris-Endonuclease linearisiert und mit Hind III gespalten (b). Ein Aliquot der DNA wurde mit Sca I (c) bzw. mit Eco R I (a) nachgespalten. Elektrophorese in 1 % Agarose. Die authentischen Hind III/Sca I-Fragmente von pAs 6 der Größen 4.5 kb und 0.55 kb (Spur c) sowie die authentischen Hind III/Eco RI-Fragmente der Größen 4.3 kb bzw. 0.8 kb (Spur a) sind markiert. Das endo/Hind III-Fragment der Größe 4.4 kb (Pfeil) wird durch Eco R I-Verdau auf ca. 4.2 kb verkürzt, es wird durch Sca I auf ca. 3.9 kb verkürzt. Mit weißen Punkten sind in Spur b drei Banden markiert, die durch Sca I-Nachspaltung nicht verkürzt werden (vgl. S. 76)
B. pAs 6-DNA wurde mit Ascaris-Endonuclease inkubiert, mit Cla I gespalten und mit ^{32}P -dGTP mittels Klenow-Polymerase 3'-endmarkiert (b, d). Ein Aliquot der DNA wurde mit Eco R I nachgespalten (c). (a) Hinf I/Eco R I-Fragmente von pBr 322-DNA: 75, 154, 220/221, 298, 348, 506, 517, 631, 1000 bp. Das endo/Cla I-Fragment der Größe 530 bp (Pfeil) ist resistent gegen Eco RI-Abbau, das endo/Cla I-Fragment der Größe 710 bp wird durch Eco R I verkürzt. C. Die Region des Gels in 18 B, die dem kb sat DNA-Insert entspricht (Größe der endo/Cla I-Fragmente zwischen 350 und ca. 1100 bp) ist vergrößert dargestellt.

Position (Abb. 9 B). Die endo/Cla I-verdaute DNA wurde mit ^{32}P -dGTP mittels Klenow Polymerase markiert. Dabei werden die 3'-Enden der Cla I-Spaltstelle radioaktiv markiert. Die entstandenen endo/Cla I-Fragmente wurden im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 18 B Spuren b, d). Es lassen sich zwei prominente Fragmente nachweisen mit dem Molekulargewicht 710 bp bzw. 530 bp. Die an der Cla I-Schnittstelle markierten endo/Cla I-Fragmente wurden mit Eco R I nachgespalten (Abb. 18 B Spur c). Die Effizienz der Eco R I-Spaltung wird durch das Auftreten des authentischen Eco R I/Cla I-Fragments (ca. 700 bp) demonstriert. Das kleinere endo/Cla I-Fragment, ca. 530 bp, weist keine Eco R I-Schnittstelle auf. Dieses Fragment wurde also durch einen endo-Schnitt im Insert von pAs 6 erzeugt (vgl. Abb. 9 B). Das 710 bp große endo/Cla I-Fragment könnte ebenfalls durch einen endo-Schnitt im Insert entstanden sein: Die zugehörige endo-Schnittstelle könnte in pAs 6 entweder an der Position 4410 bp oder an der Position 730 bp, also im Insert, liegen. In beiden Fällen würde das endo/Hind III-Fragment der Größe 4.4 kb durch Eco RI verkürzt. Durch Eco R I-Nachspaltung kann die Lage dieser endo-Schnittstelle daher nicht eindeutig bestimmt werden (vgl. Abb. 9 B).

Im Unterschied zu den Ergebnissen mit dATP-Markierung an endo-gespaltener pUC 8-DNA zeigt sich hier, daß offensichtlich endo-generierte Enden durch dGTP mittels Klenow-Polymerase markiert werden: Das Auftreten neuer Banden nach Eco R I-Nachspaltung zeigt, daß endo/Cla I-Fragmente existieren, die nicht nur an der Cla I-Schnittstelle, sondern auch an den durch die Ascaris-Endonuclease erzeugten Enden markiert sind.

Unabhängig davon konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Endonuclease eine Schnittstelle im kb sat DNA-Insert von pAs 6 erkennt. Aus der Länge des Fragments ergibt sich die Position der Schnittstelle (vgl. Abb. 9 B). Die Schnittstelle liegt asymmetrisch innerhalb des kb sat DNA-Inserts (vgl. Diskussion).

IV. DISKUSSION

1. Die Organisation der im Somagenom verbleibenden Satelliten-DNA

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Organisation der im Somagenom von A. suum verbleibenden Satelliten-DNA untersucht. Durch Restriktionsanalyse konnte gezeigt werden, daß die soma sat DNA in Clustern einer Größe von ca. 2 -15 kb vorliegt (Abb. 1). Eine einheitliche Organisationsstruktur dieser DNA gibt es demnach nicht. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden, wonach in Hefe wie auch in Trypanosoma die telomernahen Blöcke von DNA-Sequenzen geringer Komplexität durch starke Größenvariation gekennzeichnet sind (Shampay et al. 1984, Van der Ploeg et al. 1984). Andererseits könnte bei Ascaris in den somatischen Kernen von Embryonen, unmittelbar nach dem Diminutionsvorgang, eine einheitliche Größe der Satelliten-DNA-Blöcke vorliegen. Die im Darm vorgefundene Variabilität wäre in diesem Fall im weiteren Verlauf der Ontogenese entstanden, eventuell durch Amplifikation der soma sat DNA. Um diese Frage zu klären, müßte die Organisation der soma sat DNA in frühen Entwicklungsstadien untersucht werden. Die beobachtete Größenvariation der Satelliten-DNA-Blöcke könnte auch auf einen Polymorphismus innerhalb der untersuchten Population von Ascariden zurückzuführen sein, da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen DNA für die Restriktionsanalyse verwendet wurde, die aus ca. 30 Tieren gewonnen und vereinigt worden war. Zur Klärung dieser Frage müßte DNA aus einzelnen Tieren gewonnen und durch Restriktion charakterisiert werden.

Etwa 35 % der Satelliten-DNA im Soma von A. suum zeigen Hypersensitivität gegen die Exonuclease Bal 31 (Abb. 3). Dies deutet auf terminale Lokalisierung dieser Sequenzen im Chromosom hin (Blackburn & Szostak 1984). Da Bal 31 auch Einzelstrangbereiche in DNA erkennt (Gray 1975) und die kb sat DNA in vitro unter Kurzzeitrenaturierungsbedingungen

Rückfaltungsstrukturen ausbildet (Bogenberger 1979, Roth und Moritz 1981), konnte die Hypersensitivität auf präferentieller Auffaltung dieser Sequenzen beruhen. Dagegen spricht, daß ein Anteil der soma sat DNA mit ähnlicher Kinetik wie die Gesamt-DNA abgebaut wird, also mit Sicherheit nicht aufgefaltet ist und auch nicht einer Auffaltungsstruktur benachbart liegt. Weiterhin mußte bei präferentieller Auffaltung interkalärer soma sat DNA die Größe des jeweiligen DNA-Fragments zu Beginn des Abbaus drastisch reduziert werden. Dies wurde nicht beobachtet (Abb. 2 B).

Im Unterschied zu den chromosomenendständigen C_nA_n-Blocks, die in Hefe (Walmsley et al. 1984) und Tetrahymena (Yao & Yao 1981) nachgewiesen wurden, sind die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten soma sat DNA-Cluster bei Ascaris nicht vernachlässigbar klein (Abb. 1), verglichen mit der mittleren Fragmentlänge, die als Resultat der Isolierungsprozedur ca. 50 kb betrug (nicht dargestellt). Deshalb muß für die Abschätzung des Anteils endständiger Cluster der Beitrag der großen Cluster zur Menge der an jedem Zeitpunkt bereits degradierten Satelliten-DNA berücksichtigt werden: Endständige Cluster von 15 kb würden erst völlig abgebaut sein, wenn bereits 60 % der Gesamt-DNA degradiert sind. Derartige Cluster von soma sat DNA würden also einen höheren Anteil interstitieller soma sat DNA vortäuschen, als tatsächlich vorhanden ist. Deshalb ist die Schätzung von 35 % endständiger soma sat DNA ein Minimalwert. Da jedoch andererseits soma sat DNA auch dann noch nachzuweisen ist, wenn die Gesamt-DNA zu mehr als 90% abgebaut ist, muß von der Existenz interstitieller Satelliten-DNA in somatischen Chromosomen ausgegangen werden.

Diese Cluster könnten mit der Elimination interkalären Heterochromatins korreliert sein, die für A. suum nachgewiesen wurde (Kolin 1977). Die Elimination interkalärer DNA wurde sowohl bei der Chromatindiminution in Cyclops (Beermann 1977) als auch bei der Macronucleusdifferenzierung des Ciliaten Oxytricha (Klobutcher et al. 1984) beobachtet.

Die Frage, ob die endständige soma sat DNA selbst an der Ausbildung der telomerischen Struktur beteiligt ist, wie für

die C_nA_n -Sequenzen der Hefe gezeigt wurde (Pluta et al. 1984), oder lediglich in der Nähe der Telomere liegt, bleibt zu klären. Die C_nA_n -Sequenzen sind bei Oxytricha in einem speziellen DNA-Protein Komplex organisiert, der von der orthodoxen nucleosomalen Organisation abweicht (Gottschling & Cech 1984).

Eine unterschiedliche Chromatinorganisation der Satelliten-DNA im Soma von A. suum konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 4). Die chromosomenendständige Lokalisierung eines Teils der soma sat DNA könnte dennoch darauf beruhen, daß innerhalb dieser Sequenzen im Keimbahngenom die Abkopplung des terminalen Heterochromatins stattfindet. Neben ihrer Funktion als Substrat im Diminutionsprozeß käme der soma sat DNA demnach protelomerische Funktion zu: An die neu erzeugten DNA-Enden würden endständig funktionelle Telomer-DNA-Sequenzen (entsprechend den bei Hefe und Tetrahymena nachgewiesenen C_nA_n -Sequenzen) assembliert, möglicherweise durch eine spezielle terminale Transferase. Ein derartiges Enzym, das C_nA_n -Sequenzen an protelomerische Sequenzen niederer Komplexität assembliert, wurde bei Tetrahymena bereits nachgewiesen (Greider & Blackburn 1985).

2. Charakterisierung der DNA-Topoisomerase I, Beziehung zu der Endonucleaseaktivität

Da im Zuge der Chromatindiminution eine Neuordnung der chromosomalen DNA stattfindet, wurden, um Hinweise auf mögliche Mechanismen der Chromatindiminution zu erhalten, DNA-adressierte Enzyme aus Entwicklungsstadien, in denen die Chromatindiminution vorbereitet wird (Sechs- bis Achtzellenstadien), isoliert und charakterisiert. Eine sequenzspezifische Endonuclease, vergleichbar mit prokaryontischen Restriktionsendonucleasen, wurde nicht gefunden.

Die Beteiligung einer weiteren Gruppe von DNA-adressierten

Enzymen, der DNA Topoisomerasen, an sequenzspezifischer DNA Umordnung konnte bereits in mehreren Fällen gezeigt werden (vgl. Einleitung). Deshalb wurde eine DNA Topoisomerase I aus diminutionsbereiten Entwicklungsstadien von A. suum über zwei Chromatographieschritte gereinigt, einige hier wichtige Eigenschaften wurden untersucht. Die Proteinkonzentration in der topo I Fraktion konnte gegenüber dem Rohextrakt etwa um Faktor 200 verringert werden, beurteilt nach der Abnahme der O.D. 280. Da die Gesamtaktivität nur unwesentlich abnahm, sollte die spezifische Aktivität im Laufe der Anreicherung etwa um Faktor 200 erhöht worden sein.

In der 0.5 M HAP-Fraktion, in der die DNA-Topoisomerase I am Ende der Fraktionierungsprozedur vorliegt, findet sich eine DNA-Bindungsaktivität, die präferentiell kb sat DNA erkennt (Abb. 10). Um zu untersuchen, ob die präferentielle Bindung an kb sat DNA eine Eigenschaft des Topoisomerase-Proteins darstellt, oder ob ein von der Topoisomerase unabhängiges Protein in der 0.5 M HAP-Fraktion die präferentielle Bindung verursacht, wurde in einem weiteren Experiment ein spezifischer Komplex zwischen dem topo I-Protein und der kb sat DNA nachgewiesen, der durch Polyäthylenglykol präferentiell ausgefällt werden kann (Abb. 11). Die Topoisomerase I bindet also präferentiell an kb sat DNA.

Die präferentielle Bindung einer DNA Topoisomerase an eine DNA Sequenz relativ geringer Komplexität, wie sie in dieser Arbeit für die Topoisomerase I aus Ascaris aufgewiesen wurde, konnte auch von Bonven et al. (1985) für die Topoisomerase I aus Tetrahymena gezeigt werden. Dieses Enzym bindet an eine repetitive Sequenz aus dem nichtkodierenden Bereich der Tetrahymena rDNA. Aus vier separaten Bindungsstellen wurde die Konsensus Sequenz AGAC⁺TTAGAAAAAATT ermittelt. Sequenzen dieses Typs wurden auch in der rDNA weiterer Eukaryonten an homologen Positionen gefunden. Die Autoren leiten aus diesen Befunden die Hypothese einer phylogenetisch konservierten Topoisomerase I Bindungsstelle ab. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Befund, daß DNA-Topoisomerase I aus Kalbsthymus in der Tetrahymena-rDNA an dieselbe DNA-Sequenz bindet.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde könnte man die präferentielle Affinität der topo I aus Ascaris zur kb sat DNA aus A. suum damit erklären, daß die repetitive Einheit der kb sat DNA eine derartige Topoisomerase-Bindungsstelle aufweist. Tatsächlich finden sich in der Sequenz der kb sat DNA von A. suum DNA-Abschnitte, die zur oben dargestellten Konsensus-Sequenz aus Tetrahymena-rDNA relativ gute Homologien aufweisen (nicht dargestellt).

Die Soma-DNA aus A. suum enthält nach dieser Hypothese ebenfalls einige dieser Sequenzen, die jedoch in der 'single-copy'-DNA im Vergleich zur kb sat DNA wesentlich seltener vorkommen. Andererseits könnte in dem in Abb. 10 dargestellten Elektrophorese-Bindungsexperiment die Bindung des Restriktionsfragments mit kb sat DNA nur zum Teil durch die Topoisomerase, zum Teil aber durch ein hypothetisches, von der Topoisomerase unabhängiges Protein verursacht sein.

Der Befund, daß 500 ng Soma-DNA nötig sind, um die präferentielle Bindung eines gegebenen Quantums Topoisomerase an ca. 7 ng kb sat DNA aufzuheben (Abb. 10 A), läßt die Abschätzung zu, daß die topo I-Bindungsstellen in der Soma-DNA um etwa Faktor 100 seltener sind als in der kb sat DNA. Um diese Hypothese abzusichern und den Vergleich mit der DNA-Topoisomerase I aus Tetrahymena zu führen, müßte die Bindungsstelle für die Topoisomerase in der kb sat DNA genau lokalisiert werden. Dazu könnte man die durch Bindung der topo I und anschließende SDS-Denaturierung in der kb sat DNA eventuell auftretenden spezifischen Einzelstrangbrüche (Bonven et al. 1985) durch Elektrophorese der DNA im denaturierenden Polyacrylamidgel auf die Base genau bestimmen. Alternativ dazu könnte man DNA-topo I-Komplexe herstellen, wie in Kap. III. 3. 2. beschrieben, und durch Exonuclease III verdauen, um die durch Protein geschützten DNA-Sequenzen zu identifizieren (Wu 1985).

Es wurde gezeigt, daß aus einer angereicherten topo I-Präparation (0.5 M HAP) durch Inkubation mit MET eine DNA-Endonuclease gewonnen werden kann. Bei Entstehung dieser Aktivität verschwindet simultan die topo I-Aktivität. Mittels nachfolgender erneuter HAP-Chromatographie kann die Endonuclease, die infolge der Inkubation mit MET nicht (mehr) an die HAP-Säule bindet, von der Topoisomerase abgetrennt

werden. In der 0.5 M HAP-Fraktion befindet sich also ein inaktiver Vorläufer der Endonuclease, der durch Inkubation mit MET aktiviert wird. Andererseits wurden in der 0.5 M HAP-Fraktion von der topo I verschiedene DNA-adressierte Enzymaktivitäten nicht beobachtet. Diese Daten legen den Schluß nahe, daß unter Einwirkung von MET aus der topo I-Aktivität die Endonuclease Aktivität erzeugt wird. Alternativ dazu könnte in der 0.5 M HAP-Fraktion ein von der Topoisomerase verschiedenes Protein enthalten sein, das durch Inkubation mit MET Endonucleaseaktivität gewinnt und simultan die Affinität zu HAP verliert. Zur abschließenden Klärung dieser Denkmöglichkeit - wenngleich sie uns als sehr unwahrscheinlich erscheint - müßte die DNA Topoisomerase I nach allen biochemischen Kriterien rein dargestellt werden. Die vorliegenden geringen Proteinmengen könnten durch spezifische Markierung der Topoisomerase, etwa durch einen Antikörper (Fleischmann et al. 1984) oder mittels einer indirekten ^{32}P -Markierung (Constantinou et al. 1985) nachgewiesen werden. An einer derartigen Präparation könnten dann Umwandlungen der Proteineigenschaften mit den Veränderungen in der apparenten Aktivität korreliert werden. Eine naheliegende Hypothese für die hier nachgewiesene Veränderung der Aktivität geht davon aus, daß durch MET bedingte Zerstörung von Disulfidbrücken die Topoisomerase in mehrere Polypeptide mit partieller Reaktionskapazität gespalten wird. Die MET-bedingte Spaltung eines Proteins in mehrere Polypeptide wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (z. B. Assoian et al. 1983).

Die Einführung von Einzelstrangbrüchen (Liu & Wang 1979, Edwards et al. 1982) und Doppelstrangbrüchen (Udvardy et al. 1985) durch DNA Topoisomerasen ist durch einige Präzedenzfälle dokumentiert. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit beschriebenen Vorgängen wird in den Experimenten mit anderen DNA-Topoisomerasen vom Typ I jedoch ein Einzelstrangbruch ausschließlich durch eine Denaturierung des DNA-topo I Komplexes erreicht. Dies gilt entsprechend für die Einführung von Doppelstrangbrüchen durch DNA Topoisomerase II (Übersicht bei Liu 1983). Derartige Spaltungen sind in allen beschriebenen Fällen verbunden mit einer kovalenten Anheftung des Proteins an

die DNA (Bonven et al. 1985). Wie die unveränderte elektrophoretische Mobilität der linearen und oc-DNA-Moleküle in den hier dargestellten Experimenten zeigt, findet eine derartige Verknüpfung mit dem Protein aus Ascaris nicht statt (Abb. 13 A). Auch konnte in Kontrollexperimenten gezeigt werden, daß die Einführung sowohl von Einzelstrangbrüchen als auch von Doppelstrangbrüchen durch die Endonucleaseaktivität aus Ascaris nicht von der Inkubation mit denaturierenden Agenzien abhängig ist: Die entsprechenden Reaktionsprodukte sind auch ohne die (im Standardansatz durchgeführte) Inkubation mit SDS vor dem Auftragen der Proben auf das Gel unverändert nachweisbar (nicht dargestellt). Die in dieser Arbeit beschriebene Endonucleaseaktivität unterscheidet sich also deutlich von den bisher beschriebenen Beispielen einer Spaltung von DNA durch Topoisomerasen (Liu 1983).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zum Nachweis der Bindung von Topoisomerase I an DNA wurden 50 ng DNA mit 2 µl der 10fach konzentrierten 0.5 M HAP-Fraktion inkubiert (Abb. 10 A). Das Auftreten der präferentiellen Bindung und der Ausgang des Kompetitionsexperiments (Abb. 10 A) zeigen, daß in diesem Experiment Bindungs-Protein und DNA etwa in stöchiometrischem Verhältnis eingesetzt wurden. Im Unterschied dazu wurde in den Experimenten, in denen in dieser Arbeit Enzymaktivitäten bestimmt wurden, je ca. 0.5 µg DNA mit 1-3 µl der nicht konzentrierten Fraktionen inkubiert. In letzterem Experiment lag also etwa 100facher DNA-Überschuß vor, verglichen mit dem DNA-Protein-Verhältnissen in den Bindungsexperimenten. Bei dieser Relation erscheint es unwahrscheinlich, daß die nachgewiesene Endonucleaseaktivität auf einer stöchiometrischen Bindung des Proteins an die DNA beruht. Vielmehr stellt auch die aufgewiesene Linearisierung von supercoil-DNA eine enzymatische Reaktion dar.

3. Zur Frage der Natur der von der Endonuclease erkannten Schnittstellen

Die aus Diminutionsstadien gewonnene Endonuclease linearisiert

supercoil-DNA des Plasmids pUC 8 (Abb. 13 A). An einer begrenzten Anzahl definierter Positionen wird genau ein Doppelstrangbruch pro Substratmolekül gesetzt, wobei die verschiedenen Schnittstellen mit unterschiedlicher Häufigkeit erkannt werden (Abb. 13 B). Da die Endonuclease ausschließlich in supercoil-DNA schneidet (Abb. 12), ist neben der DNA-Sequenz zur Ausbildung einer Schnittstelle auch eine bestimmte DNA-Konformation notwendig. So wurde z. B. für die Nuclease S_1 , die Doppelstrang-DNA nur in superhelikaler Form schneidet, gezeigt, daß ausgebildete Einzelstrangauffaltungen eine notwendige und hinreichende Bedingung für einen Schnitt darstellen (Lilley 1980). Die dargestellten Resultate über die Positionen der Schnittstellen der Ascaris-Endonuclease in pUC 8-DNA sprechen dafür, daß DNA-Sequenzfolgen mit unterbrochener Spiegelbildsymmetrie, sogenannte interrupted inverted repeats (IIR) eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die Ausbildung einer Schnittstelle für die Ascaris-Endonuclease darstellen. Für derartige DNA Sequenzfolgen wurde gezeigt, daß sie in supercoil-DNA Einzelstrangauffaltungen (sogenannte "stem loops") ausbilden können (Lilley 1981).

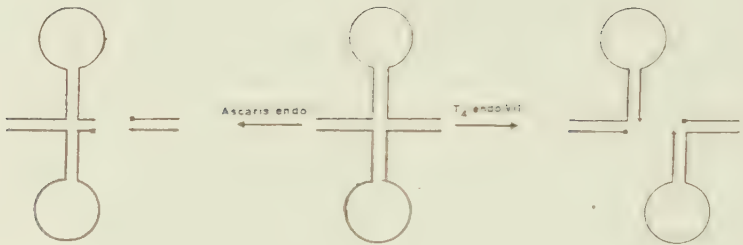
In pUC 8-DNA gibt es eine Reihe guter IIR-Elemente hoher Qualität, die nicht zur Ausbildung einer prominenten Schnittstelle führen (z. B. IIR 5, Qualität= 28; zur Definition der Qualität siehe Seite 58). Deshalb sind weitere Parameter zur Ausbildung einer Schnittstelle von Bedeutung. Da die "stem loop" Strukturen in nackter DNA nur zu einem marginalen Anteil ausgebildet sind (Gellert 1983), sie also möglicherweise erst durch die Bindung des Proteins hinreichend stabilisiert werden, könnte die Form der Rückfaltungsschleife von Bedeutung sein. Zum Beispiel könnte für eine effektive Bindung des Proteins eine definierte "loop"-Größe erforderlich sein. Diese Möglichkeit wurde überprüft (Tab. 1): Die aus der Sequenz ermittelten besten IIR der pUC 8-DNA, IIR 8 und IIR 1, sind mit je einer Schnittstelle (E_g , E_a) korreliert. Die jeweiligen "loops" sind 28 (IIR 8) bzw. 27 (IIR 1) Nucleotide lang. Der in der Rangfolge der Qualitäten nächstfolgende IIR 5, in dessen Nahe keine Schnittstelle liegt, weist dagegen einen "loop" von nur drei Nucleotiden auf. Demnach könnte die Ausbildung einer Schnittstelle eine bestimmte Mindestgröße des "loop" erfordern.

In der Tat ergibt eine Untersuchung der besten IIR innerhalb von pUC 8, daß die Schnittstellen mit den besten IIR korreliert sind, wenn nur "stem-loops" mit einer "loop"-Größe von 24 bis 28 Nucleotiden berücksichtigt werden. Die entsprechenden IIR sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Abgrenzung der für die Ausbildung einer Schnittstelle zugelassenen "loop"-Größe sind einige der IIR-Elemente hoher Qualität, in deren Nähe keine Schnittstelle liegt, ebenfalls dargestellt (Tab. 1): Offensichtlich sind "loops" einer Größe von 30 Nucleotiden oder mehr (z. B. IIR 10) zur Ausbildung einer Schnittstelle ebenso ungeeignet wie "loops", die weniger als 24 Nucleotide enthalten (z. B. IIR 12).

Gemäß dieser Hypothese lassen sich die prominenten Schnittstellen jeweils IIR-Elementen zuordnen. Jedoch sind mit den vorliegenden Daten die Kriterien für eine prominente Schnittstelle noch nicht vollständig erfaßt: So wurde z. B. in unmittelbarer Nachbarschaft der Schnittstelle E_i (760 bp) kein IIR hoher Qualität gefunden; diese zusätzliche Schnittstelle könnte eventuell durch den IIR 2 (836-888 bp) bedingt sein, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft bereits die Schnittstellen E_h und E_a nachgewiesen wurden. Außerdem treten möglicherweise weitere minore Schnittstellen im Bereich des größten Hinf I-Fragments von pUC 8-DNA auf, die durch die relativ insensitive Analyse mittels der Agarosegele nicht entdeckt wurden. Diese würden außerhalb des Bereiches von pUC 8 liegen, der durch die Feinanalyse erfasst wurde (Position ca. 500 -2000 bp). Wenngleich deshalb das Kriterium der loop-Größe, wie oben verwendet, möglicherweise nicht absolut gilt, dürfte die formulierte Hypothese aufgrund der ermittelten signifikanten Korrelationen dennoch im Grundsatz richtig sein.

Die Länge des "stem" variiert bei den in Tab. 1 aufgeführten IIR-Elementen zwischen acht und vierzehn Basenpaaren, ungeachtet dessen, ob ein IIR-Element eine endo-Schnittstelle ausbildet oder nicht. Die Länge des "stem" ist demnach kein Kriterium für die Fähigkeit eines IIR-Elements, eine endo-Schnittstelle auszubilden.

A



B

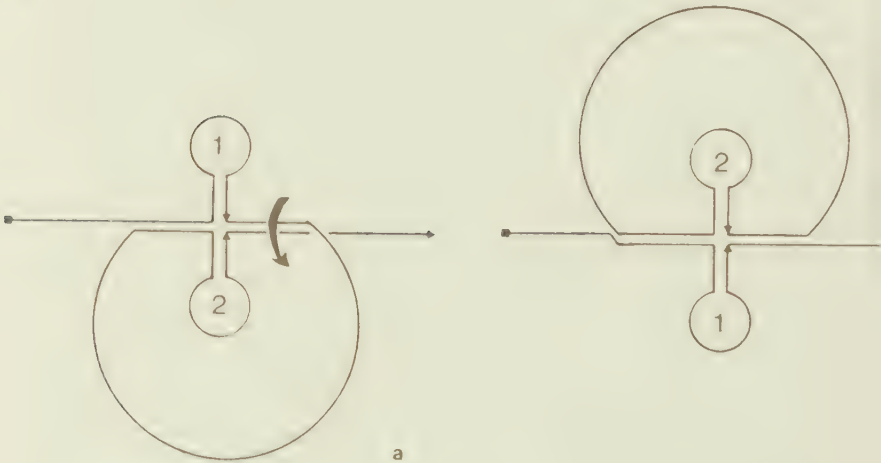


Abb. 19: A. Vergleich der Aktivität der T₄-Endonuclease VII mit der für die Endonuclease aus Ascaris postulierten Aktivität. Dargestellt ist die Auflösung einer "stem-loop"-Struktur durch T₄ endo VII (vgl. Lilley & Kemper 1984) sowie die postulierte Auflösung der Struktur durch die Endonuclease aus Ascaris (vgl. S. 73).
B. Modellvorstellung für die Elimination interkalaren Chromatins während die Abkopplung terminaler Heterochromatinblöcke

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung der Legende zu Abb. 19

theoretisch an dem in A dargestellten DNA-Substrat stattfinden kann, wobei zur Abkopplung lediglich ein Endonucleaseschnitt erforderlich wäre, muß für die Elimination interkalärer DNA zusätzlich die Ausbildung einer Doppelstrang-DNA-Schleife angenommen werden (vgl. S. 81). Dadurch werden zwei zunächst räumlich getrennte potentielle Diminutionsstellen in geordneter Weise zusammengeführt (a). Geordnete Neuverknüpfung der DNA-Stränge im Bereich der 'stem-loop'-Strukturen führt zur Freisetzung vormals interkalärer DNA, hier als DNA-Ring (b). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur einer der beiden komplementären Einzelstränge dargestellt.

Auffaltungs-Struktur im DNA Molekül darstellt (Gellert 1983); die Häufigkeit anderer Sekundärstrukturen in demselben Molekül wird durch die mit der Auffaltung des IR verbundene Reduzierung der superhelikalen Dichte stark verringert. Die Tatsache, daß supercoil-DNA dieses Plasmids von der Ascaris-Endonuclease nur in geringem Ausmaß linearisiert wird, der perfekte IR also nicht zur Ausbildung einer prominenten Schnittstelle führt, unterstützt die oben formulierte Hypothese, daß IIR-Elemente nur dann geschnitten werden, wenn sie im Zuge der Enzymreaktion eine Auffaltung erfahren und dann einen "loop" (einer bestimmten Größe) aufweisen.

Die Erfordernisse zur Ausbildung einer Schnittstelle sind möglicherweise durch die bisher durchgeführte Analyse noch nicht eindeutig definiert worden (vgl. vorigen Absatz). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß in klonierter kb sat DNA von A. suum innerhalb von sechs tandemartig angeordneten Monomeren der kb sat DNA neben evtl. auftretenden minoren Schnittstellen eine prominente Schnittstelle ausgebildet wird (Abb. 18). Deren Position wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt, sie befindet sich in der Nachbarschaft der in der repetitiven Einheit vorhandenen Bam H I Spaltstelle (Abb. 9 B).

Die Region der pUC 8 DNA, in der die prominenten endo-Schnittstellen nachgewiesen wurden (700 -1700 bp), ist auch in pBr 322 DNA enthalten (Vieira & Messing 1982). Diese Region liegt in der Karte von pAs 6 (Abb. 9 B) zwischen den Positionen 3.1 kb und 4.1 kb. endo/Hind-Fragmente, die durch Endonuclease Schnitt in dieser Region erzeugt werden, sollten zwischen 3.1 und 4.1 kb groß sein und durch Sca I Nachspaltung nicht verkürzt werden. Unter den in Abb. 18 A dargestellten endo/Hinf I Fragmenten gibt es drei Banden mit derartiger Größe (Spur b), die durch Sca I nicht verkürzt werden (Spur c). Die in pUC 8 DNA ausgebildeten Schnittstellen sollten also von den jeweiligen DNA Abschnitten auch in pAs 6 DNA ausgebildet sein. Eine genaue Analyse dieser Schnittstellen ist mit dem dargestellten Gel nicht möglich.

Durch Computeranalyse des Monomers der kb sat DNA von A. suum mit dem Programm "STEMLOOP" wurden innerhalb der 123 bp vielfältige Möglichkeiten zur Ausbildung von

Abb. 20: Darstellung einer "stem-loop"-Struktur in der repetitiven Einheit der kb sat DNA von A. suum, die möglicherweise mit einer Schnittstelle korreliert ist

```

                    T G G A T C C A A C T
5'..A A G A A C C*G A*T G A T C           C G
    / / / / / / / / / /
3'..C C C T T A T T A A C T A G           A
                    T A A T A A A C G G C
```

Aus der Nucleotidsequenz der kb sat DNA (Streeck et al. 1982) ist der Bereich des möglicherweise für die Ausbildung der endo-Schnittstelle wichtigen IIR-Elements entnommen. Basenpaarungen sind durch / gekennzeichnet. Mit * sind die Basen gekennzeichnet, die in einem gewissen Anteil der authentischen Kopien des Monomers durch andere Basen ersetzt sind (vgl. S. 78). Die Bam H 1-Spaltstelle ist unterstrichen.

"stem-loop"-Strukturen ermittelt. Es wurde ein IIR mit einem lückenlosen "stem" von fünf Nucleotiden und einem "loop" von 25 Nucleotiden in der Nachbarschaft der Bam H 1-Spaltstelle gefunden (Abb. 20). Die Qualität im so ermittelten "stem" erreicht nur den Wert 12. Durch Ausdehnung des "stem"-Bereichs findet man drei weitere gepaarte Basen, die die Qualität der Auffaltungsstruktur auf 19 erhöhen würden. Die bei dieser Anordnung in Kauf genommenen vier ungepaarten Basen (Lücke im "stem") liegen in einem Bereich, der sich in der Sequenzanalyse der kb sat DNA als Region erhöhter Variabilität erwies (Streeck et al. 1982). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, daß zwischen den sechs Kopien der repetitiven Einheit in pAs 6-DNA an dieser kritischen Stelle geringfügige Unterschiede bestehen, die zu erheblicher Variation in der Prominenz der einzelnen potentiellen Schnittstellen führen würden. Diese Möglichkeit wäre zu prüfen durch Sequenzanalyse von pAs 6-DNA. Die unterschiedliche Prominenz der Schnittstellen wäre dann durch die Sequenzunterschiede zwischen den sechs klonierten Monomeren bedingt. Weiterhin könnte eine einmal ausgebildete Struktur die Ausbildung weiterer potentieller endo-Schnittstellen in ihrer Nachbarschaft behindern, so daß nicht jedes der kb sat DNA Monomere innerhalb des Hexamers in pAs 6 eine prominente Schnittstelle ausbildet, wie ja auch in vivo nur wenige Kopien der repetitiven Einheit in den Eliminationsprozeß aktiv involviert sind.

4. Zusammenfassung der Resultate und deren Interpretation bezüglich möglicher Mechanismen der DNA Neuordnung im Zuge der Chromatindiminution

Die vorgelegten Resultate lassen sich zu folgendem Gesamtbild zusammenfassen: Durch Charakterisierung mittels der Exonuclease Bal 31 konnte gezeigt werden, daß bei A. suum die im Soma verbleibende Satelliten-DNA in der Nähe der Chromosomenenden liegt. Dieses Resultat läßt sich, unter Berücksichtigung der Tatsache, daß interkalares wie auch terminales Heterochromatin eliminiert wird (Kolin 1977), so

interpretieren, daß der Prozess der Excision von DNA sowie die Abkopplung von telomerischem Heterochromatin an den Übergangsstellen zwischen dem die kb sat DNA enthaltenden Heterochromatin und dem Euchromatin, jedoch ausschließlich innerhalb der Satelliten-DNA, stattfindet. Die Proteine, die diesen Prozeß katalysieren, sollten an die kb sat DNA binden. In der Tat konnte eine DNA-Topoisomerase I isoliert werden, die präferentiell an die kb sat DNA bindet.

Durch die unterschiedliche Kondensation von Euchromatin und Heterochromatin entsteht, im Zuge der metaphasischen Kondensation der diminutionsbereiten Keimbahnchromosomen, an den Übergangsstellen zwischen beiden Chromatintypen torsionaler Stress. Diese besondere topologische Situation führt zur Ausbildung einer "Diminutions-Struktur" an dieser Stelle. Die postulierte lokale Sekundärstruktur an der präsumptiven Bruchstelle des Chromosoms wäre verantwortlich für die Bindung des Proteins an dieser Stelle, während der überwiegende Anteil der kb sat DNA nicht bindungsfähig ist. Diese hypothetische Eigenschaft des Diminutionsenzym steht in guter Übereinstimmung mit der hier nachgewiesenen Eigenschaft der Endonuclease aus Ascaris, daß in einem klonierten Hexamer der kb sat DNA eine prominente Schnittstelle erkannt wird.

Die DNA-Topoisomerase I könnte die für die Elimination interkalaren Materials erforderliche Neuverknüpfung der DNA-Stränge ausführen. Eine derartige Funktion wurde für eine andere DNA-Topoisomerase I, das Int-Protein des Phagen λ , bereits nachgewiesen (Nash 1981). Dieses Protein ist zusätzlich in der Lage, synthetische Cruciforme aufzulösen, wenn diese bestimmte DNA-Sequenzen des λ -Genoms ("attachment sites") enthalten, durch die in vivo die rekombinative Excision vermittelt wird (Hsu & Landy 1984). Eine rekombinative Neuverknüpfung von DNA-Einzelsträngen unterschiedlicher Herkunft kann auch durch andere DNA-Topoisomerasen in vitro durchgeführt werden, wie z. B. für DNA-Topoisomerase I aus HeLa-Zellen gezeigt wurde (Halligan et al. 1982).

Die für die Neubildung von Telomeren (Szostak 1983) erforderliche Durchtrennung eines DNA-Doppelstranges an spezifischen Positionen könnte durch die hier nachgewiesene

Endonucleaseaktivität erfolgen, wenn man annimmt, daß eine ausgebildete DNA Rückfaltungsstruktur das Signal für einen derartigen Schnitt darstellt. Eine Untersuchung der im Zuge der Macronucleusentwicklung des Ciliaten Tetrahymena neugebildeten Gen großen Mini Chromosomen ergab, daß in allen untersuchten Fällen neugebildeter Telomere sich ein oder zwei partiell palindromische Sequenzelemente in der Nachbarschaft des funktionellen Telomers befinden, ca. 10 bis 30 bp von den C_nA_n -Sequenzen entfernt. Diese IIR-Elemente werden als Signale zur Neubildung von Telomeren aus Micronucleus-DNA interpretiert (Blackburn et al. 1985).

Auch die Elimination kurzer interkalärer Sequenzen könnte durch die Ascaris-Endonuclease vermittelt werden: Beim Ciliaten Oxytricha wurde die DNA-Sequenz einiger Stellen bestimmt, an denen DNA interkalär eliminiert wird. Aus dem Vergleich der Sequenzen vor und nach der Elimination kommen Klobutcher et al. (1984) zu dem Schluss, daß die in der Micronucleus-DNA aufgewiesenen 'interrupted inverted repeats' am Eliminationsvorgang beteiligt sind.

5. Ein Modell zum Mechanismus der Chromatindiminution bei Ascaris

Soweit untersucht, sind bei Prokaryonten an den Vorgängen von sequenzabhängiger DNA Umordnung ('site specific recombination') DNA-Topoisomerasen beteiligt. Die für den Prozeß der Chromatindiminution zu fördernden Reaktionsschritte konnten von den beiden in dieser Arbeit charakterisierten Enzymaktivitäten katalysiert werden. Die präsentierten Daten machen es wahrscheinlich, daß die Endonucleaseaktivität durch partielle Denaturierung der Topoisomeraseaktivität entsteht, also beide katalytischen Reaktionen durch ein und dasselbe Protein vermittelt werden.

Damit lassen sich alle vorgelegten Befunde in dem folgenden Modell über den Verlauf der Chromatindiminution zusammenfassen (Moritz 1984 a, 1984 b): Im Zuge der metaphasischen Kondensation bindet die DNA Topoisomerase I an

die keimbahnbegrenzte DNA. Durch die Bindung des Enzyms und den torsionalen Stress am Übergang zwischen Euchromatin und Heterochromatin wird durch Auffaltung der Satelliten-DNA in "stem-loops" eine bestimmte Struktur ausgebildet, die "Diminutionsstelle".

Durch die der Topoisomerase intrinsische Endonucleaseaktivität wird neben dieser Struktur die Kontinuität beider DNA-Stränge aufgehoben. Daraufhin wird durch Neuverknüpfung der DNA-Stränge die Abkopplung des zu eliminierenden Materials erreicht (Abb. 19 A). Gleichzeitig wird ein neues Telomer gebildet.

Zur Erklärung der Elimination interkalaren Heterochromatins wird angenommen, daß zwei derartige Auffaltungsstrukturen, die zunächst räumlich getrennt vorliegen, in Wechselwirkung treten, wobei die entstehende chromosomale Überstruktur im Prinzip die von Campbell (1962) für die Excision der λ -DNA aus dem *E. coli*-Genom postulierte DNA-Schleife darstellt (Abb. 19 B). In unserem Modell führt die dann einsetzende DNA-Neuanordnung zur Elimination derjenigen DNA, die im Keimbahngenom zwischen den beiden potentiellen Diminutionsstellen lokalisiert ist. In diesem Fall wird die Kontinuität des Chromosoms durch die topo I-vermittelte Religation der DNA wiederhergestellt.

Zur Bestätigung des Modells könnte man jetzt darangehen, die aufgewiesenen Enzymaktivitäten mit noch zu konstruierenden Plasmiden, die mehrere Blöcke der kb sat DNA in geeigneter Größe und geeigneter Anordnung enthalten, zu einem in vitro Diminutions-Test zu kombinieren. Ein derartiges System konnte zum Beispiel für die rekombinative Excision der λ -DNA etabliert werden (Mizuuchi & Mizuuchi 1978).

Die angeführten Analogien zu Telomerbildung und DNA-Elimination in anderen Organismen sprechen dafür, daß die Mechanismen eukaryontischer DNA-Neuordnung möglicherweise phylogenetisch gut konserviert sind, sowohl hinsichtlich der Struktur der DNA-Substrate (Shapiro 1983) als auch der Beteiligung von DNA-Topoisomerasen.

V. Zusammenfassung

Bei Ascaris suum wird im Zuge der Chromatindiminution der größte Anteil der hochrepetitiven DNA, die von der restlichen Keimbahn-DNA mittels Ultrazentrifugation als Satelliten-DNA abgetrennt werden kann, aus dem Genom eliminiert, während einige Kopien der repetitiven Einheit im Somagenom verbleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß ein Teil der im Soma verbleibenden Kopien der keimbahnbegrenzten Satelliten-DNA an den Enden der somatischen Chromosomen liegt (S. 21 f). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß die der Diminution vorausgehende DNA-Umordnung innerhalb der Satelliten-DNA stattfindet. Die im Soma verbleibenden Kopien der keimbahnbegrenzten DNA sind in Clustern variabler Größe angeordnet, die zwischen 20 und 150 Kopien der repetitiven Einheit enthalten. Mittels Verdau des Chromatins aus somatischen Kernen mit Micrococcus-Nuclease und anschließender 'Southern blot' Analyse wurde gezeigt, daß zumindest der größte Anteil der im Soma verbleibenden Kopien der keimbahnbegrenzten Satelliten DNA in demselben Nucleosomentyp verpackt ist wie die Gesamt-DNA (S. 23 f).

Um einen Hinweis auf denkbare enzymatische Teilreaktionen der im Zuge der Chromatindiminution stattfindenden DNA Umordnung zu erhalten, wurden DNA adressierte Enzyme aus frühen Entwicklungsstadien isoliert. Eine DNA Topoisomerase I sowie eine Endonucleaseaktivität aus Vier- bis Achtzellenstadien von A. suum wurden über zwei chromatographische Fraktionierungen mittels Phosphocellulose bzw. Hydroxylapatit gereinigt (S. 27 ff.).

Durch Nachweis spezifischer Komplexe aus DNA Topoisomerase und Kopien der keimbahnbegrenzten Satelliten-DNA mittels fraktionierender Ausfällung durch Polyäthylenglykol wurde gezeigt, daß die DNA-Topoisomerase präferentiell an die keimbahnbegrenzte DNA bindet (S. 39 f). Die DNA-Protein-Komplexe wurden auch durch Veränderung der elektrophoretischen Mobilität eines DNA-Fragments aus keimbahnbegrenzter Satelliten-DNA nachgewiesen (S. 37 f). Durch diese Befunde wird die Hypothese unterstützt, daß im Zuge der

Chromatindiminution die DNA-Topoisomerase I spezifisch an die kb sat DNA bindet und - im nächsten Schritt - die rekombinative Exzision der keimbahnbegrenzten DNA ausführt.

Durch Alterung einer topo I-Präparation in Gegenwart von Mercaptoäthanol entsteht eine Endonucleaseaktivität, während die topo I-Aktivität simultan verschwindet (S. 29 ff.). Die Endonucleaseaktivität könnte demnach durch partielle Denaturierung aus der DNA-Topoisomerase I hervorgehen.

Die DNA-Endonuclease schneidet ausschließlich supercoil-DNA. Das Enzym erkennt sieben prominente Schnittstellen in pUC 8-DNA (S. 41 ff.). Die Feinanalyse mittels hochauflösender Polyacrylamid- Gelelektrophorese von endmarkierten DNA-Fragmenten ergab, daß die Schnittstellen jeweils einem DNA-Abschnitt unterbrochener Spiegelbildsymmetrie ('interrupted inverted repeat', im folgenden bezeichnet als IIR-Element) benachbart liegen (S. 57 ff.). Mittels eines Computerprogramms wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit eines IIR-Elements und der Ausbildung einer Schnittstelle nachgewiesen. Die IIR-Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft von Endonuclease-Schnittstellen zeichnen sich aus durch eine "loop"-Größe zwischen 24 und 28 Nucleotiden vor anderen, die nicht mit einer Schnittstelle korreliert sind (S. 69 ff.).

Um spezifische Wechselwirkungen der Endonuclease mit der keimbahnbegrenzten DNA zu untersuchen, wurde ein Hexamer (738 bp = 6 x 123 bp) der repetitiven kb sat DNA kloniert (S. 33 f.). In der supercoil-DNA des resultierenden Plasmids pAs 6 erkennt die Endonuclease eine prominente Schnittstelle innerhalb des Hexamers (S. 58 ff.).

Mit diesen Befunden wird die Hypothese unterstützt, daß im Zuge der Diminution eine Auffaltung der kb sat DNA stattfindet, an der die Topoisomerase I bindet. Die hier für die Aktivität der Endonuclease, die als partiell denaturierte DNA-Topoisomerase I interpretiert wird, nachgewiesene Spezifität für Auffaltungsstrukturen macht eine Beteiligung derartiger Intermediate an der DNA-Umordnung wahrscheinlich.

VI. LITERATUR

Aebi, H. (1971):

Einführung in die praktische Biochemie. S. Karger Verlag Basel

Ammermann, D. (1971):

Morphology and Development of the macronuclei of the ciliates
Stylonychia mytilus and Euplotes aediculatus.

Chromosoma 33, 209-238

Ando, T. (1966):

A Nuclease Specific for Heat-Denatured DNA Isolated from a
Product of Aspergillus oryzae

Biochemica Biophys. Acta 114, 158-168

Assoian, R. K., Komorya, A. , Meyers, C. Miller, D. , Sporn, M.
(1983):

Transforming Growth Factor 8 in Human Platelets

J. Biol. Chem. 258 7155-7160

Austerberry, C. , Allis, C. , Yao, M.(1985):

Specific DNA Rearrangements in Synchronously Developing Nuclei
of Tetrahymena

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81, 7383-7387

Bauer, H. & Beermann, W. (1952) :

Chromosomale Soma Keimbahn Differenzierung bei Chironomiden
Naturwissenschaften 39, 22-23

Beermann, S. (1977):

The diminution of heterochromatic chromosomal segments in
Cyclops (Crustacea, Copepoda)

Chromosoma 60, 297-344 (1977)

Blackburn, E. , Challoner, P. (1984):
Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma*
brucei
Cell 36, 447-457

Blackburn, E. & Szostak, J. (1984):
The molecular structure of centromeres and telomeres.
Ann. Rev. Bioch. 53, 163-194

Blackburn, E. , Challoner, P., Cherry, M. , Howard, E., Ryan,
T. , Spangler, E. (1985):
Genomic Rearrangements in Macronucleus Development of
Tetrahymena. In: Genome Rearrangement Simon, M. , Herskowitz,
I. (eds) UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol.
20, 191-203.

Bogenberger, J. (1979):
Untersuchungen an den Chromosomen von *Ascaris*:
Lichtmikroskopische Karyotypanalyse, Elektronenoptische
Darstellung der Chromosomen nach Histonentfernung und von
keimbahnbegrenzter DNA
Dipl.-Arbeit Univ. München

Bonnevie, K. (1901):
Über Chromatindiminution bei Nematoden. Jen. Zeitschr. f.
Naturwissensch. Bd. XXXVI

Bonven, B. J. , Gocke, E. , Westergaard, O. (1985):
A High-Affinity-Topoisomerase I Binding Site Is Clustered at
DNase I Hypersensitive Sites in Tetrahymena R-Chromatin
Cell 41, 541-551 (1985)

Boveri, T. (1887):

Über die Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von Ascaris megalocephala. Anat. Anz. 2, 688-693

Boveri, T. (1904):

Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. G. Fischer Verlag, Jena

Bushman, W. , Yin, S. , Thio, L. , Landy, A. (1984):

Determinants of Directionality in Lambda Site-Specific Recombination

Cell 39, 699-706

Campbell, A. M: (1962):

The Episomes. Adv. Genetics 11, 101 - 145

Constantinou, A. I. , Squinto, S. , Jungmann, R. (1985):

The Phosphoform of the Regulatory subunit of Cyclic-AMP-dependent Protein kinase Possesses Intrinsic Topoisomerase I Activity.

Cell 42, 429

Crouse, G. , Frischauf, A. , Lehrach, H. (1983):

An Integrated and Simplified Approach to Cloning into Plasmids and Single-Stranded Phages

Methods of Enzymology 101, 78-89

Dawson, D. , Herrick, G. (1984): Telomeric properties of

C_4A_4 homologous long sequence blocks in micronuclear DNA of Oxytricha. Cell 36, 171-177

- Devereux, J. , Haeberli, P. , Smithies, O. (1984):
A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX
Nucl. Acids Res. 12, 387-395
- Earnshaw, W. , Halligan, B. , Cooke, C. , Heck, M. , Liu, L.
(1985):
Topoisomerase II Is a Structural Component of Mitotic
Chromosome Scaffolds. J. Cell Biol. 100, 1706-1715
- Edwards, K. A. , Halligan, B. , Davis, J. , Nivera, N. , Liu,
L. (1982):
Recognition sites of eukaryotic DNA topoisomerase I: DNA
nucleotide sequencing analysis of topoisomerase I cleavage
sites on SV 40 DNA. Nucl. Acids Res. 10, 2565-2576
- Edwards, L. (1910):
The idiochromosomes in *Ascaris megalocephala* and *Ascaris
lumbricoides*
Arch. f. Zellforsch. 5, 422-429
- Fleischmann, G. , Pflugfelder, G., Steiner, E. , Jahaverian, K.
, Howard, G. , Wang, J. , Elgin, S. (1984):
Drosophila DNA topoisomerase I is associated with
transcriptionally active regions of the genome. Proc. Nat.
Acad. Sci. USA 81, 6958-6962
- Gellert, M. (1981):
DNA Topoisomerases. Ann. Rev. Biochem. 50, 879- 910
- Gellert, M. , O'Dea, M. , Mizuuchi, K. (1983):
Slow cruciform transitions in palindromic DNA. Proc. Nat. Acad.
Sci. USA 80, 5545-5549

Goday, C. , Pimpinelli, S. (1984):

Chromosome Organization and Heterochromatin Elimination in *Parascaris*. *Science* 224, 411-413

Gottschling, D. & Cech, T. (1984):

Chromatin structure of the molecular ends of *Oxytricha* macronuclear DNA: phased nucleosomes and a telomeric complex, *Cell* 38, 501-510

Gray Jr., H. B. , Ostrande, D. , Hodutt, J. , Legerski, R. , Robberson, D. (1975):

Extracellular Nucleases of *Pseudomonas* Bal 31
Nucl. Acids Res. 2, 1459-1469

Greider, C. W. , Blackburn, E. (1985):

Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in *Tetrahymena* Extracts. *Cell* 43, 405-413

Halligan, B. D. , Davis, J. L. , Edwards, K. A. , Liu, L. F. (1982):

Intra- and Intermolecular Strand Transfer by HeLa DNA Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 257, 3995-4000

Haecker, V. (1897):

Die Keimbahn von Cyclops

Arch. für mikroskop. Anatomie und Entwicklungsgeschichte, Band 49, Cohen Verl. Bonn

Herrick, G. et al. (1985):

Mobile Elements Bounded by C₄A₄ Telomeric repeats in *Oxytricha fallax*. *Cell* 43, 759-768

Hsieh, T. & Brutlag, D. (1980):

ATP-Dependent DNA-Topoisomerase From *Drosophila melanogaster*
Reversibly Catenates Duplex DNA Rings
Cell 21, 115-125

Hsu, P. L. & Landy, A. (1984):

Resolution of Synthetic att site Holliday structures by the
Integrase Protein of Bacteriophage Lambda
Nature 311, 721-726

Jansen, P. (1982):

Untersuchungen zur Chromatindiminution bei Ascaris: Vergleich
von DNA-adressierten Enzymen in frühen Entwicklungsstadien.
Dipl.-Arbeit Univ. München

Jensch, F. , Kemper, B. (1986):

Endonuclease VII resolves Y-junctions in branched DNA in vitro
EMBO J. 5, 181-189

Kafatos, F. , Jones, L. , Efstratiadis, A. (1979):

Determination of Nucleic Acid Sequence Homologies and Relative
Concentrations By a Dot Hybridization Procedure
Nucl. Acids Res. 7, 1541-1552

Klobutcher, L. , John, C. , Prescott, D. (1984):

Internal sequences are eliminated from genes during
macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha*
nova, Cell 36, 1045-1055

Kmieciak, E. , Angelides, K. , Holloman, W. (1985):

Left-Handed DNA and the Synaptic Pairing reaction Promoted by
Ustilago Rec 1 Protein. Cell 40, 139-145

Kolin, I. (1977):

Untersuchungen zu Anzahl und Morphologie der Chromosomen sowie zur Verteilung hochrepetitiver DNA in Soma und Keimbahn von *Ascaris*

Dipl.-Arbeit Univ. München

Landy, A. & Ross, W. (1977):

Viral Integration and Excision: Structure of the lambda att sites

Science 197, 1147-1160

Lilley, D. M. J. (1980):

The inverted repeat As a Recognizable Structural Feature in Supercoiled DNA molecules

Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6468-6472

Lilley, D. M. J. (1981):

Hairpin-loop-formation by inverted repeats in supercoiled DNA is a local and transmissible property.

Nucl. Acids Res. 9, 1271-1289

Lilley, D. & Kemper, B. (1984):

Cruciform-Resolvase Interactions in Supercoiled DNA

Cell 36, 413-422

Liu, L. F. (1983):

DNA topoisomerases: enzymes that catalyse the breakage and rejoining of DNA. CRC Crit. Rev. Biochem. 15, 1-24

Liu, L. F. & Wang, J. C. (1979):

Interaction between DNA and Escherichia coli DNA-Topoisomerase I. Formation of Complexes between the protein and Superhelical and Non-superhelical Duplex-DNAs

J. Biol. Chem. 254, 1082-1088

Hsieh, T. & Brutlag, D. (1980):

ATP-Dependent DNA-Topoisomerase From *Drosophila melanogaster*
Reversibly Catenates Duplex DNA Rings
Cell 21, 115-125

Hsu, P. L. & Landy, A. (1984):

Resolution of Synthetic att site Holliday structures by the
Integrase Protein of Bacteriophage Lambda
Nature 311, 721-726

Jansen, P. (1982):

Untersuchungen zur Chromatindiminution bei *Ascaris*: Vergleich
von DNA-adressierten Enzymen in frühen Entwicklungsstadien.
Dipl.-Arbeit Univ. München

Jensch, F. , Kemper, B. (1986):

Endonuclease VII resolves Y-junctions in branched DNA in vitro
EMBO J. 5, 181-189

Kafatos, F. , Jones, L. , Efstratiadis, A. (1979):

Determination of Nucleic Acid Sequence Homologies and Relative
Concentrations By a Dot Hybridization Procedure
Nucl. Acids Res. 7, 1541-1552

Klobutcher, L. , John, C. , Prescott, D. (1984):

Internal sequences are eliminated from genes during
macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha*
nova, Cell 36, 1045-1055

Kmieciak, E. , Angelides, K. , Holloman, W. (1985):

Left-Handed DNA and the Synaptic Pairing reaction Promoted by
Ustilago Rec 1 Protein. Cell 40, 139-145

Kolin, I. (1977):

Untersuchungen zu Anzahl und Morphologie der Chromosomen sowie zur Verteilung hochrepetitiver DNA in Soma und Keimbahn von *Ascaris*

Dipl.-Arbeit Univ. München

Landy, A. & Ross, W. (1977):

Viral Integration and Excision: Structure of the lambda att sites

Science 197, 1147-1160

Lilley, D. M. J. (1980):

The inverted repeat As a Recognizable Structural Feature in Supercoiled DNA molecules

Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6468-6472

Lilley, D. M. J. (1981):

Hairpin-loop-formation by inverted repeats in supercoiled DNA is a local and transmissible property.

Nucl. Acids Res. 9, 1271-1289

Lilley, D. & Kemper, B. (1984):

Cruciform-Resolvase Interactions in Supercoiled DNA

Cell 36, 413-422

Liu, L. F. (1983):

DNA topoisomerases - enzymes that catalyse the breakage and rejoining of DNA. CRC Crit. Rev. Biochem. 15, 1-24

Liu, L. F. & Wang, J. C. (1979):

Interaction between DNA and Escherichia coli DNA-Topoisomerase I. Formation of Complexes between the protein and Superhelical and Non-superhelical Duplex-DNAs

J. Biol. Chem. 254, 1082-1088

Maniatis, T. , Fritsch, E. , Sambrook, J. (1982):
Molecular Cloning. A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory

Merrill, C. , Goldman, D. , Vankeuren, M. (1982):
Simplified Silver Protein Detection and Image Enhancement
Methods in polyacrylamide gels
Electrophoresis 3, 17-23

Meyer, O. (1895):
Celluläre Untersuchungen an Nematodeneiern. Jen. Zeitschrift.
Zitat nach Boveri 1904

Mizuuchi, K. , Mizuuchi, M. (1979):
Integrative Recombination of Bacteriophage lambda. In vitro
study of the Intermolecular Reaction
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 1111-1114

Moritz, K.B. & Roth, G. E. (1976):
Complexity of germ line and somatic DNA in Ascaris
Nature 259, 55-57

Moritz, K. B. (1984 a):
Der molekulare Mechanismus der Chromatindiminution. Zugleich
ein Beitrag zur Telomerorganisation und -Dynamik. Verh. Dtsch.
Zool. Ges. 77, 197

Moritz, K B (1984 b):
Telomeric Organization: A model deduced from chromatin
diminution in Ascaris
in: Chromosomes Today (eds. M. D. Bennet, A. Gropp & U. Wolf)
8, 326 (G. Allen & Unwin , London, 1984)

Moritz, K. B. (1970):

DNS-Variation imkeimbahnbegrenzten Chromatin und autoradiographische Befunde zu seiner Funktion bei *Parascaris equorum*

Verh. Dtsch. Zool. Ges. 64, 36-42

Müller, F. , Walker, P. , Aeby, P. , Neuhaus, H. , Felder, H. , Back, E. , Tobler, H. (1982):

Nucleotide Sequence of satellite DNA contained in the Eliminated Genome of *Ascaris lumbricoides*

Nucl. Acids Res. 10, 7493-7510

Nash, H. A. (1981):

Integration and Excision of Bacteriophage lambda - The Mechanismus of Conservative Site-specific Recombination

Ann. Rev. Genet. 15, 143-167

Neumüller, W. (1985):

Die Lokalisation von Satelliten-DNA in den Chromosomen von Keimbahn und Soma von *Parascaris equorum*

Dipl.-Arbeit Univ. München

Pluta, A. , Dani, G. , Spear, B. , Zakian, V. (1984):

Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81, 1475-1479

Prell, B. & Vosberg, H.P. (1980):

Analysis of Covalent complexes Formed between Calf Thymus DNA-Topoisomerase I and Single-stranded DNA

Eur. J. Biochem. 108, 389-398

Roth, G. E. & Moritz, K. B. (1981):
Restriction Enzyme Analysis of the germ line limited DNA of
Ascaris suum
Chromosoma 83, 169-190

Roth, M. , Prescott, D. (1985):
DNA Intermediates and Telomere Addition during Genome
Reorganization in *Euplotes crassus*. Cell 41, 411-417

Schmidt, E. R. (1984):
Clustered and Interspersed Repetitive DNA Sequence Family of
Chironomus - The nucleotide Sequence of the Cla I-Elements and
of Various Flanking sequences
J. Mol. Biol. 178, 1-15

Seidl, C. (1985):
Die Kerndifferenzierung in nackten Ganzkeimen unter der
Einwirkung verschiedener Hemmstoffe und in isolierten
Blastomeren von *Parascaris equorum univalens*. Dipl.-Arbeit
Univ. München.

Shampay, J. , Szostak, J. , Blackburn, E: (1984):
DNA sequences of telomeres maintained in yeast
Nature 310, 154-157

Shapiro, A. J. (1983):
Mobile Genetic Elements (Academic Press, New York, 1983)

Southern, E. M. (1975):
Detection of specific sequences among DNA fragments separated
by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517

Streeck, R. E. , Beer, K. , Moritz, K. B. (1982):
Chromatin diminution in *Ascaris suum*: Nucleotide sequence of
the Eliminated Satellite DNA
Nucl. Acids Res. 10, 3495-3502

Sutcliffe, J. G. (1982):
Complete Nucleotide Sequence of *Escherichia coli* Plasmid pBr 322
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46, 77-90

Szostak, J. (1983):
Replication and resolution of telomeres in yeast
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 1187-1194

Teschke, C. (1985):
Unusual Cleavage Pattern of the germ line limited Satellite DNA
of *Parascaris equorum univalens*
Naturwissenschaften 72, 207 - 209

Tobler, H. (1985):
The differentiation of germ and somatic cell lines in
nematodes. In: Hennig, W. (ed.), germ line-soma
differentiation, results and problems in cell differentiation
Vol. 10; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Udvardy, A. , Schedl, P. , Sander, M. , Hsieh, T. (1985):
Novel Partitioning of DNA cleavage sites for *Drosophila*
Topoisomerase II
Cell 40, 933-941

Van der Ploeg, L. , Lin, A. , Borst, P. (1984):
Structure of the growing telomeres of Trypanosomes
Cell 36, 459-468

Vieira, J. & Messing, J. (1982):

The pUC plasmids, An M 13 mp 7-derived System for Insertion
Mutagenesis and Sequencing with universal Primers
Gene 19, 259 -278

Wang, J. C. (1982):

DNA Topoisomerasen

Spektrum d. Wissensch. 9/82, 100-111

Walmsley, R. , Szostak, J. , Petes, T. (1983):

Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes ?
Nature 302, 84

Walmsley, R. , Chan, C. , Tye, B. , Petes, T. (1984):

Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast
chromosomes
Nature 310, 157-160

Wu, C. (1985):

An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and
TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts
Nature 317, 84

Yao, M. & Yao, K. (1981): Repeated hexanucleotide C-C-C-C-A-A
is present near free ends of macronuclear DNA of Tetrahymena,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 7436-7439

Zuker, M. & Stiegler, P. (1981):

Optimal computer folding of large RNA sequences using
thermodynamics and auxiliary information
Nucl. Acids Res. 9, 133-148

Danksagungen

Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl Moritz danke ich für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit und die engagierte Mitwirkung daran durch viele anregende Diskussionen und Verbesserungsvorschläge. Frau Gaby Solleder danke ich für ausgezeichnete technische Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Börries Kemper und Herrn Frank Jensch vom Institut für Genetik der Universität Köln bin ich sehr verbunden für ihre engagierte Anteilnahme an dieser Arbeit und die Möglichkeit, einige Experimente am dortigen Institut durchführen zu können.

Herrn Dr. H.-J. Fritz vom MPI für Biochemie in Martinsried danke ich für die großzügig gewährte Möglichkeit, einige Experimente in seinem Labor durchführen zu können. Herrn Dr. Dietmar Kamp vom MPI für Biochemie in Martinsried danke ich für seine ausdauernde Unterstützung bei der Computer-gestützten Sequenzanalyse.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und andere als die angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe.

München, den 4. 6. 1986

LEBENS LAUF

Pidder Jansen

geboren 5.11. 56 in Kraiburg/ Bayern

Abitur abgelegt am Ruperti-Gymnasium in Mühldorf im Juni 1975

Von Oktober 1975 bis April 1981 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Diplom 1982 in den Fächern Zoologie, Genetik und Biochemie

Von Sommer 1981 bis Juni 1982 Anfertigung der Diplomarbeit: "Untersuchung von DNA-adressierten Enzymen aus diminutionsbereiten Entwicklungsstadien von *Ascaris suum*" unter Anleitung durch Dr. K. Moritz am Zoologischen Institut der Universität München.

Seit Juni 1982 Anfertigung der Dissertation bei Herrn Dr. K. Moritz.

September 1982 Eheschließung mit Frau Sylvia Dürr.

April 1983 Geburt der Tochter Susanne.

